

**Aus dem Med. Zentrum für Hygiene und Med. Mikrobiologie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk
Institut für Virologie
Leiter: Prof. Dr. H.-D. Klenk**

**UNTERSUCHUNGEN ZUM GENETISCHEN
POLYMORPHISMUS DES ORF UL142 DES
HUMANPATHOGENEN CYTOMEGALIEVIRUS**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin**

**dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg**

vorgelegt

**von
Maren Bergmann
aus Lübeck**

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 22.05.2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. B. Maisch
Referent:	Prof. Dr. K. Radsak
Correferent:	Prof. Dr. L. Flores de Jacoby

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Klinik der HCMV-Infektion	1
1.1.1 Krankheitsverläufe	1
1.1.1.1 Neugeborene	1
1.1.1.2 Immunsupprimierte	4
1.1.2 Diagnose	5
1.1.2.1 Differentialdiagnosen	5
1.1.2.2 Labordiagnostische Methoden	5
1.1.3 Therapie und prophylaktische Ansätze	6
1.2 Virologische Aspekte	7
1.2.1 Taxonomie	7
1.2.2 Virionstruktur	9
1.2.3 Genomstruktur	10
1.2.4 Viraler Infektionszyklus und Morphogenese	11
1.3 Unterschiede zwischen an humane Fibroblasten adaptierten und wildtypischen-HCMV-Laborstämmen bzw. klinischen Isolaten	13
1.3.1 Virulenz und Zelltropismus	13
1.3.2 Molekulargenetische Unterschiede	14
2 Zielsetzung der Arbeit	16
3 Material	17
3.1 Bezugsquellen	17
3.2 Chemikalien	17
3.3 Antibiotika	18
3.4 Kulturmediengrundstoffe	19
3.5 Restriktionsendonukleasen	19
3.6 Sonstige Enzyme	19
3.7 Sonstige Materialien	19
3.8 Geräte	20
3.9 Medien	20
3.10 Puffer	21
3.11 Zellen	22

3.11.1 Primäre humane Hautfibroblasten (HF)	22
3.12 Virusstämme	22
3.12.1 Laborstämme	22
3.12.2 Patientenisolat aus Urin	22
3.13 Bakterienstämme	25
3.13.1 E.coli XL1-Blue	25
3.13.2 E.coli JM109	25
3.14 Plasmid	26
3.14.1 Der Vektor pGEM®-T	26
3.15 Oligonukleotide	27
3.15.1 Oligonukleotide für die Sequenzierung	28
3.15.2 Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
4 Methoden	29
4.1 Zellbiologische Methoden	29
4.1.1 Kultivierung humaner Fibroblasten	29
4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
4.1.3 Virusanzüchtung aus Patientenproben	30
4.1.4 Herstellung von Virusstocks und Virustitration	30
4.2 Molekularbiologische Methoden	32
4.2.1 DNA-Extraktion aus Patientenisolaten mit QIAamp DNA Mini Kit	32
4.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Abschnitten	33
4.2.2.1 <i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	33
4.2.2.2 <i>nested PCR</i>	34
4.2.3 Agarosegelelektrophorese	36
4.2.4 Reinigung von PCR-Produkten	37
4.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten	37
4.2.6 Transformation von E.coli	38
4.2.6.1 <i>Herstellung kompetenter Zellen</i>	38
4.2.6.2 <i>Transformation</i>	38
4.2.7 Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	39
4.2.7.1 <i>Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA im kleinen Maßstab</i>	39

4.2.7.2 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA im großen Maßstab	40
4.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	42
4.2.9 Analytische Restriktion von DNA	42
4.2.10 Sequenzierung von DNA	42
4.2.10.1 Sequenzierreaktion	42
4.2.10.2 Aufreinigung der Sequenzieransätze	43
4.2.10.3 Sequenziergel und Elektrophorese	44
4.3 Computeranalysen	45
5 Ergebnisse	46
5.1 Nachweis des ORF 142 in HCMV-Isolaten durch PCR/nested PCR	46
5.2 Subklonierung der UL142-Amplifikate in den Vektor pGEM®-T	51
5.2.1 Ligation, Transformation und Überprüfung der Konstrukte	51
5.3 Analyse der spezifischen DNA-Amplifikate der Isolate mittels Sequenzierung und Computeranalysen	53
5.4 Phylogenetische Analyse	56
5.5 Alignment der sequenzierten Isolate auf Aminosäureebene	58
6 Diskussion	63
6.1 Auswahl der Isolate	64
6.2 Deduzierte Eigenschaften des UL142	65
6.3 Korrelation zum klinischen Phänotyp	66
7 Zusammenfassung	67
8 Literatur	68
9 Anhang	78
9.1 Abkürzungsverzeichnis	78
9.2 Buchstabencode der gängigen Aminosäuren	79
9.3 UL142-Sequenz	80
9.4 Deduzierte AS-Sequenz des UL 142	81
9.5 Abbildungsverzeichnis	82
9.5 Tabellenverzeichnis	82

Verzeichnis der akademischen Lehrer	83
Danksagung	84

1 Einleitung

1.1 Klinik der HCMV-Infektion

1.1.1 Krankheitsverläufe

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) ist als Infektionserreger ubiquitär verbreitet, wobei der Mensch das einzige Reservoir für das Virus darstellt. Der Grad der Durchseuchung zeigt in Abhängigkeit von den sozioökonomischen Bedingungen z. T. erhebliche Unterschiede (Britt & Alford, 1996; Krech, 1973, Kumar & Nankervis, 1979): Innerhalb der westlichen Länder liegt die Durchseuchungsrate bis zum 20. Lebensjahr bei 20% und in der Gruppe der über 40-jährigen zwischen 40% und 100%. Deutlich höher ist der Grad der Durchseuchung in den sogenannten Entwicklungsländern, in denen bereits bis zu 100% der Kinder Antikörper gegen HCMV aufweisen (Britt & Alford, 1996).

Die Übertragung erfolgt horizontal durch Tröpfchen- und Schmierinfektion über Speichel, Urin, Sperma, Cervixsekret, vertikal u. a. über die Muttermilch und iatrogen über Blutprodukte und Organtransplantate. Nach einer Primärinfektion, die beim Gesunden meist asymptomatisch bzw. mit einer katarrhalischen Symptomatik verläuft, persistiert das Cytomegalievirus lebenslang, nur durch gelegentliche Phasen der Reaktivierung unterbrochen, latent im Organismus.

Bei kongenital infizierten Neugeborenen und immunsupprimierten Patienten führt das HCMV in Folge einer Primärinfektion oder auch Reaktivierung zu unterschiedlich ausgeprägten Krankheitsverläufen, wobei die Pathogenese im einzelnen bisher nur teilweise verstanden wird.

1.1.1.1 Neugeborene

Ausschlaggebend für den klinischen Verlauf ist der Zeitpunkt der Infektion. Die Übertragung des Virus von der Mutter auf das Neugeborene kann transplazentar (praenatal), während der Geburt (perinatal) oder über die Muttermilch bzw. durch Kontaktinfektion (postnatal) erfolgen (Tab.1).

<i>Infektionsweg</i>	<i>Serostatus der Mutter</i>	<i>HCMV- Infektion beim Kind</i>
praenatal	Seropositiv	0,5-1%
	Seronegativ (Primärinfektion während der Schwangerschaft)	20-40%
perinatal	Seropositiv	5%
	bei Virusausscheidung im Genitaltrakt	50%
postnatal	Seropositiv	25%
	bei Virusausscheidung in der Muttermilch	65-75%

Tab. 1: **Vertikale Übertragungswege einer HCMV-Infektion** (R. Pass, 2000, Fields)

a. Praenatale Infektion

Das HCMV stellt in den westlichen Ländern noch vor Röteln die häufigste Ursache für eine intrauterine infektiöse Schädigung dar. Das Virus gelangt u. a. mit infizierten Leukozyten in die Plazenta und nach Replikation in Plazenta-Fibroblasten, -Synzytiotrophoblasten und -Zytotrophoblasten in den fetalen Kreislauf (Fisher et al., 2000; Hemmings et al., 1998).

Es sind ca. 0,3-1% aller Neugeborenen infiziert, wobei das Risiko einer praenatalen Infektion davon abhängig ist, ob die Mutter eine Primärinfektion oder eine rekurrierende Infektion durchläuft (Abb. 1).

Bei ca. 10% der Primärinfektionen kommt es zu Ausbildungen bleibender Schädigungen, wie Wachstumsstörungen, Taubheit, Lernbehinderungen.

Dies bedeutet, dass bei einer geschätzten Geburtenrate von 800.000 Geburten in Deutschland pro Jahr ca. 2.400 Kinder kongenital infiziert sind und von diesen ca. 240 Kinder Schädigungen aufweisen. Von den bei Geburt asymptomatischen 90% der Infizierten (ca. 2160 Kinder) entwickeln bis zu 10% Spätschäden (ca. 216 Kinder). Somit sind in Deutschland jährlich ungefähr 450 HCMV-infizierte Kinder von Folgeschäden betroffen (M. Eggers, Stuttgart, persönliche Mitteilung).

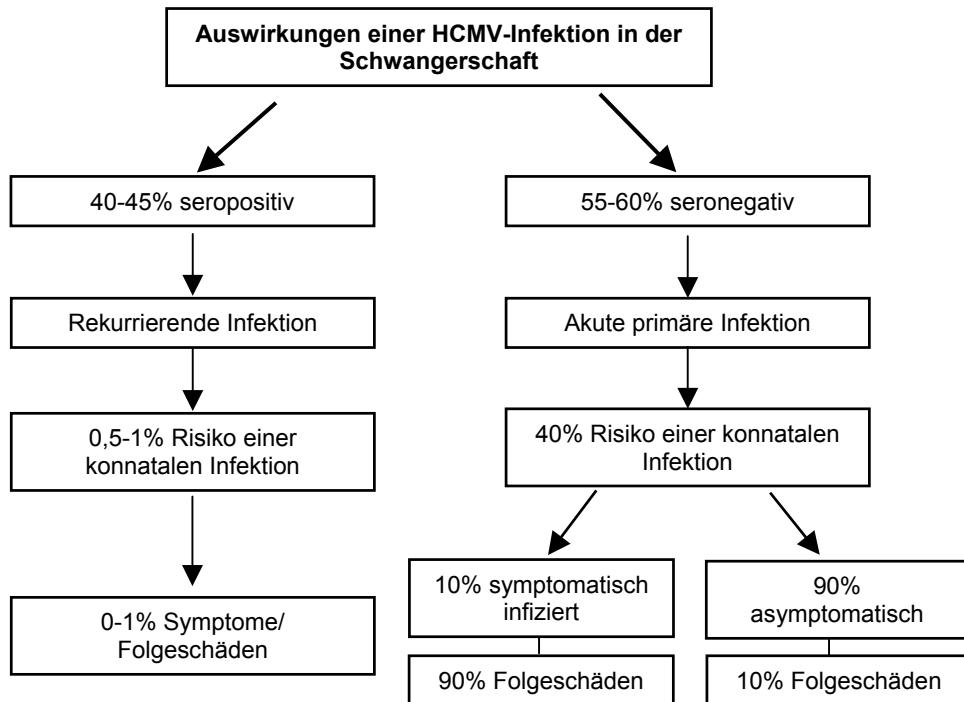


Abb. 1: **Auswirkungen einer HCMV-Infektion in der Schwangerschaft** (M. Eggers, Stuttgart, persönliche Mitteilung)

Eine besonders schwere Form der pränatalen Infektion stellt das kongenitale Cytomegaliesyndrom dar (Doerr, 1987), welches u. a. durch Thrombozytopenie, Hepatosplenomegalie, Chorioretinitis, Mikrozephalie und Petechien gekennzeichnet ist und bei 20-30% der geschädigten Kinder im ersten Lebensjahr letal verläuft.

b. Peri- u. postnatale Infektion

Das Neugeborene kann während der Geburt durch im Geburtskanal ausgeschiedenes Virus oder nach der Geburt über Kontaktinfektion bzw. bei einer seropositiven Mutter über virushaltige Muttermilch infiziert werden (Tab. 1). Die postnatale Infektion ähnelt im Krankheitsverlauf der Infektion eines Erwachsenen und kann asymptomatisch oder mit einer katarrhalischen Symptomatik einhergehen.

1.1.1.2 Immunsupprimierte (HIV, Transplantatempfänger)

Bei Patienten, die unter Immunsuppression stehen, beispielweise Organ- u. Knochenmarkstransplantatempfänger oder Patienten mit erworbener Immundefizienz (AIDS) können generalisierte oder organbezogene HCMV-Infektionen zu lebensbedrohlichen Zuständen führen. HCMV ist einer der häufigsten Erreger opportunistischer Erkrankungen (Tab. 2), welcher die Behandlung immunsupprimierter Patienten kompliziert. Die mit einer hohen Morbidität und Mortalität behafteten Komplikationen, wie Retinitis, Enzephalitis, Pneumonitis, Hepatitis, gastrointestinalen Ulzerationen und kutanen Läsionen können Folge einer Primärinfektion, Reaktivierung des latenten Virus oder Reinfektion sein (Hinkle et al., 2000). Bei AIDS-Patienten stellt die durch HCMV verursachte atypische interstitielle Pneumonie eine der häufigsten Todesursachen dar (Macher et al., 1983). Bei Empfängern solider Organe kann die Infektion nach Transplantation zudem auch zu Dysfunktion und Abstoßung des transplantierten Organs führen (Grattan et al., 1989; Britt WJ, 1996). Bei Komplikationen nach Knochenmark-Transplantation ist die HCMV-Infektion eine der häufigsten Todesursachen (Meyers J.D., 1989) (Tab. 2).

Erkrankung	Empfänger solider Organe	Knochenmarks- Empfänger	AIDS-Patient
Fieber/Hepatitis	++	+	+
Gastrointestinal Ulzerationen	+	+	+
Retinitis	+	+	++
Pneumonie	+	++	+
Myelosuppression		++	
Enzephalopathie			+
Polyradikulitis			+
Abstoßung/Spender- Empfänger-Reaktion	+	?	
Atherosklerose	+		
Exitus	+	+	+

Tab. 2: **HCMV-Erkrankungen bei Immunsupprimierten:** + auffällig, ++ schwerwiegend, ? nicht eindeutig geklärt (Griffiths PD, 2002)

1.1.2 Diagnose

1.1.2.1 Differentialdiagnose

Die herkömmlichen Anzeichen einer konnatalen Cytomegalieinfektion beim Neugeborenen sind eher unspezifisch. Toxoplasmose, Syphilis und Röteln, sowie nicht infektiöse Erkrankungen wie Erythroblastosis fetalis, Osteopetrosis und metabolische Erkrankungen wie Ikterus, Petechien und Organvergrößerungen weisen eine Symptomatik auf, die der konnatalen HCMV-Infektion ähnlich ist.

Bei Transplantatempfängern ist die Symptomatik ebenfalls eher als unspezifisch zu bezeichnen, da eine Vielzahl viraler (Epstein-Barr Virus und Humanes Herpesvirus 6) und nicht viraler Infektionen, wie auch Spender-Empfänger-Reaktionen Symptome wie Fieber, Leukopenie, Hepatitis, Pneumonitis, Enteritis oder Funktionsstörungen des Spenderorgans bedingen können.

Erkrankungen bei AIDS-Patienten sind typischerweise Chorioretinitis, Enteritis oder Oesophagitis, die auch andere viral, bakteriell und mykologisch bedingte Ursachen haben können (R. Pass, 2000, Fields).

1.1.2.2 Labordiagnostische Methoden

Diagnostische Methoden zum Nachweis einer bestehenden HCMV-Infektion und einer Cytomegalie-assoziierten Erkrankung beinhalten die Virusanzüchtung in Zellkultur, histologische Untersuchung, serologische Methoden, Nachweis des viralen pp65 Antigens in Leukozyten und Detektion viraler Nukleinsäuren mittels molekularbiologischer Methoden (PCR) (M.D. de Jong et al., 1998).

Die Zellkultur stellt eine sensitive und spezifische Nachweis-Methode dar, die jedoch sehr zeitaufwendig ist, da der charakteristische cytopathische Effekt (CPE) sich erst nach 5-28 Tagen beobachten lässt (B. Yen-Liebermann, 2000). Allerdings bietet die Zellkultur eine Möglichkeit zur näheren Charakterisierung des Virus (J.v.d. Meer et al., 1998).

In Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gewebeproben weisen infizierte Zellen eine Vergrößerung, sowie intranukleäre Einschlüsse auf und werden als „Eulenaugen-Zellen“ bezeichnet. Diese histologische Methode ist nicht sensitiv und nur noch von historischem Interesse.

Die Diagnosestellung durch serologische Methoden (z.B. Mikropartikel-Enzymimmunoassay (MEIA), Immunoblot) beinhaltet das Testen auf HCMV-spezifisches Immunglobulin und setzt eine bereits erfolgte positive Immunreaktion voraus (J.v.d. Meer et al., 1998). Der Mikropartikel-Enzymimmunoassay stellt einen quantitativen Nachweis von Antikörpern der IgG-Klasse im Serum oder Plasma dar. Der Immunoblot dient dem qualitativen Nachweis spezifischer Antikörper der IgG- und IgM-Klasse gegen definierte Proteine des HCMV in Serum oder Plasma.

Ein sensibler und spezifischer Nachweis von HCMV in der Blutbahn ist die Identifizierung des im Tegument lokalisierten Phosphoproteins pp65 (Van der Bij et al., 1988). Der Test dient dem Nachweis dieses HCMV-spezifischen Genprodukts (pUL83; pp65), das während der akuten HCMV-Infektion vornehmlich bei Immunsupprimierten im Kern granulozytärer Blutleukozyten nachweisbar ist. Dieser Cytomegalievirus-pp65-Antigen-Nachweis mittels Immunfluoreszenz ist schnell und bietet den Vorteil der annäherungsweisen Quantifizierung, was eine Überwachung der HCMV-Aktivität bzw. der Effizienz einer antiviralen Therapie zulässt.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Detektion viraler DNA in Geweben, Leukozyten, Plasma, Liquor, broncho-alveolarer Flüssigkeit und Urin (Smith & Dunstan, 1993). Dieser Nachweis ist abhängig von der Detektionsmethode sowohl qualitativ als auch quantitativ durchführbar.

Die zur Zeit gängigen Methoden zum diagnostischen Virusnachweis sind die Virus-DNA Bestimmung mittels quant. HCMV DNA PCR, quant. MEIA, qual. Immunoblot und der semi-quantitative pp65-Antigen Nachweis.

1.1.3 Therapie und prophylaktische Ansätze

Als antivirales Chemotherapeutikum steht Ganciclovir (9-[1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl]guanin) zur Verfügung. Es wird durch eine viruseigene Kinase

(pUL97) in den infizierten Zellen aktiviert (Sullivan *et al.*, 1992) und wirkt als Inhibitor der viralen DNA-Polymerase (Matthews & Boehme, 1988, Oram & Herold, 1998). Foscarnet (Phosphonoameisensäure) oder Cidofovir als neueres Nukleotidanalogue (Hinkle *et al.*, 2000) werden ebenfalls als Inhibitoren der viralen Polymerase eingesetzt, sind allerdings aufgrund ihrer starken Toxizität nur bedingt geeignet. Darüber hinaus sind bereits Resistenzentwicklungen beschrieben worden (Mascolini, 1996).

In den 70/80iger Jahren wurden Impfstoff-Studien mit lebenden attenuierten HCMV-Stämmen (z.B. Towne) durchgeführt, die allerdings nicht den gewünschten Erfolg verzeichneten.

Zur Zeit werden verschiedene Strategien zur Entwicklung eines Impfstoffs verfolgt. Diese beinhalten Versuche mit immunogenen Glykoprotein-Bereichen, Vacciniavirus-Vektoren mit inserierten HCMV-Genen sowie mit rekombinanter Plasmid-DNA (Plotkin SA, 2001).

1.2 Virologische Aspekte

1.2.1 Taxonomie

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) wird entsprechend der Klassifikation des „Internationalen Komitees für Virustaxonomie“ (ICTV) den Herpesviridae zugeordnet (Roizman *et al.*, 1981). Die Virusfamilie umfaßt mehr als 100 beschriebene Spezies, von denen acht humanpathogen sind (Tab.4). Die Viren dieser Familie zeichnen sich durch ihren typischen Aufbau aus. Sie bestehen aus einem Kern, der ein lineares doppelsträngiges DNA-Genom enthält, einem ikosaedrischen Kapsid, umgeben von einer Protein-Matrix, dem Tegument, und einer Hüllmembran, die die viralen Glykoproteine enthält. Ein weiteres charakteristisches Merkmal aller Herpesviren ist ihre Eigenschaft im Körper latent zu persistieren. Die Vertreter dieser Familie lassen sich aufgrund ihrer Pathogenität, ihres Wirtsspektrums, der Dauer ihres Replikationszyklus, der Cytopathologie und des Zelltropismus in drei Unterfamilien gliedern, den α -, β - und γ -Herpesvirinae (Tab. 3).

Die α - *Herpesvirinae* kennzeichnet ein breites Wirtsspektrum in vitro und ein kurzer Replikationszyklus. Diese neurotrophen Viren, deren bekanntester Vertreter das Herpes Simplex Virus (HHV 1/2) ist, persistieren in sensorischen Ganglien des Wirtes.

Die β - *Herpesvirinae*, zu denen das HCMV (HHV 5) gehört, weisen in vivo und in vitro eine strikte Speziespezifität auf und durchlaufen in vitro einen langsamen Replikationszyklus. Sie sind grundsätzlich lymphotrop und können in Lymphozyten und mononukleären Zellen, aber auch in anderen Geweben und verschiedenen Organen, wie z.B. der Niere persistieren. Die Vergrößerung der infizierten Zellen ist verantwortlich für die Namensgebung (Cytomegalie).

Die Familie der γ - *Herpesvirinae* zeigt eine ausgeprägte Gewebsspezifität, sie infizieren vorwiegend B- und T- Lymphozyten und persistieren in lymphoiden Geweben. Viren dieser Subfamilie, zu denen das Epstein Barr Virus (HHV 4) und das Kaposi-Sarkoma assoziierte Virus (HHV 8) gehören, besitzen zudem onkogene Eigenschaften.

Subfamilie	Synonym	Abkürzung	Literatur
α- <i>Herpesvirinae</i>	Herpes simplex Virus 1 (<i>Humanes Herpesvirus 1</i>)	HSV 1, HHV 1	(Gruter, 1924)
	Herpes Simplex Virus 2 (<i>Humanes Herpesvirus 2</i>)	HSV 2, HHV 2	(Schneeweis, 1962)
	Varizella-Zoster Virus (<i>Humanes Herpesvirus 3</i>)	VZV, HHV 3	(Dumas <i>et al.</i> , 1981)
β- <i>Herpesvirinae</i>	Humanes Cytomegalie Virus (<i>Humanes Herpesvirus 5</i>)	HCMV, HHV 5	(Smith, 1956)
	Humanes Herpesvirus 6	HHV 6	(Lindquister&Pellett, 1991)
	Humanes Herpesvirus 7	HHV 7	(Frenkel <i>et al.</i> , 1990)
γ- <i>Herpesvirinae</i>	Epstein-Barr Virus (<i>Humanes Herpesvirus 4</i>)	EBV, HHV 4	(Epstein <i>et al.</i> , 1965)
	Kaposi-Sarkoma assoziiertes Virus (<i>Humanes Herpesvirus 8</i>)	HHV 8	(Chang <i>et al.</i> , 1994)

Tab. 3: Klassifizierung der humanpathogenen Herpesviren (Roizman *et al.*, 1992).

1.2.2 Virionstruktur

Das HCMV weist die typische Herpesvirusarchitektur auf, die den Viruskern, das Nukleokapsid, das Tegument und die virale Hüllmembran beinhaltet (Abb. 2).

Das 230 Kilobasenpaar (kb) große doppelsträngige DNA-Genom und assoziierte Proteine bilden den elektronendichten Viruskern, der einen Durchmesser von etwa 64 nm besitzt (Wright et al., 1964). Dieser wird von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, welches sich aus 162 Kapsomeren zusammensetzt und einen Durchmesser von 100 nm besitzt. Kern und Kapsid bilden zusammen das Nukleokapsid, welches in eine amorphe Proteinmatrix, die fast ausschließlich aus Phosphoproteinen besteht, eingebettet ist. Diese Matrix wird als Tegument bezeichnet. Das Phosphoprotein pp65 kann dabei bis zu 95% der Proteinmasse des Teguments ausmachen (Gibson & Irmieri, 1984). Die Virushülle besteht aus einer etwa 11 nm dicken Lipiddoppelschicht (Tooze et al., 1993), in die sowohl zelluläre als auch virale Glykoproteine eingelagert sind.

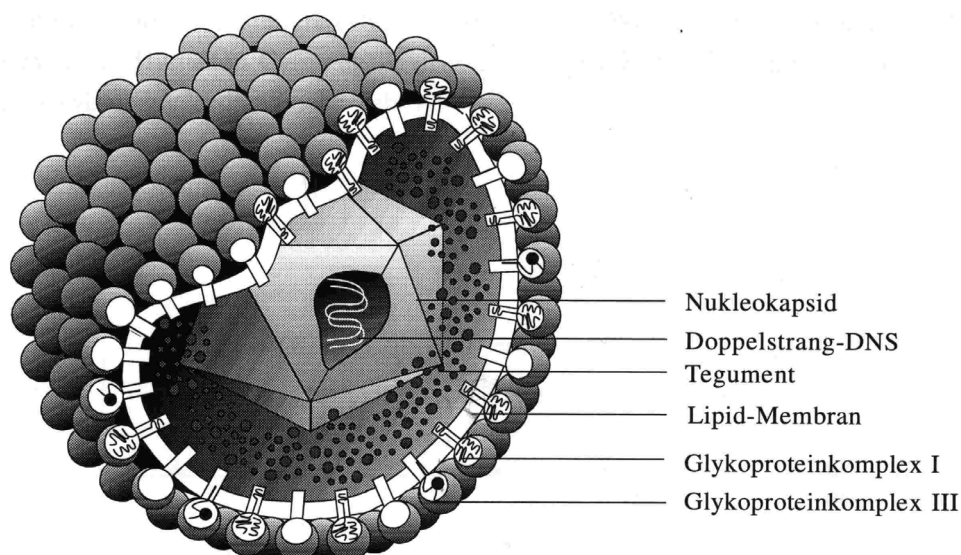


Abb. 2: **Schematische Darstellung des humanen Cytomegalievirus (HCMV)** (©M. Reschke, 1994-97, Institut für Virologie, Marburg)

1.2.3 Genomstruktur

Mit 230 kb besitzt das HCMV das größte Genom aller humanpathogenen Herpesviren. Es besteht aus einem linearen DNA-Doppelstrang und wird in einen längeren (UL= unique long) und einen kürzeren (US= unique short) nicht repetitiven Abschnitt unterteilt. Diese beiden Segmente können jeweils in unterschiedlichen Orientierungen zueinander vorliegen, so dass sich vier Genom-Isomere ergeben, die in äquimolaren Verteilungen in jeder Viruspopulation gefunden werden (Oram et al., 1982). In Abb. 3 ist der als „P“ definierte Genom-Prototyp dargestellt. Das UL-Segment ist eingerahmt von den invertierten repetitiven Sequenzen b und b', das US-Segment entsprechend von den Sequenzen c und c'. An den Enden des Virusgenoms und an der Verbindungsstelle zwischen den nicht repetitiven Abschnitten UL und US finden sich weitere Sequenzbereiche, deren Anzahl und Länge variabel sind und als „a-Sequenz“ bezeichnet werden. Das Molekulargewicht der DNA beträgt $1,5 \times 10^8$ Dalton (Chee et al., 1990; Stinski et al., 1990) und der GC-Gehalt liegt bei 57,2% (Chee et al., 1989).

Das Genom des Laborstammes AD 169 ist vollständig sequenziert und weist 208 offene Leserahmen (ORF) auf, von denen 54 für potentielle Glykoproteine kodieren (Chee et al., 1990). Nach der aktuellen Nomenklatur (First Nomenclature Workshop; Landini und Spaete, 1993) erfolgt die Benennung der Gene gemäß ihrer Lokalisation auf dem Genom mit den Präfixen UL oder US. Für virale Proteine, Phosphoproteine und Glykoproteine werden die Abkürzungen p, pp und gp verwendet.



Abb. 3: **Aufbau des Prototyp-Genoms des humanen Cytomegalievirus**

Dargestellt ist der Prototyp „P“ des HCMV- Genoms. Die Pfeile bezeichnen die Orientierung der Segmente zueinander. Ori_{Lyt} bezeichnet den Replikationsursprung.

1.2.4 Viraler Infektionszyklus und Morphogenese

Die Anlagerung des HCMV an die Wirtszelle erfolgt zuerst durch eine unspezifische Bindung an Heparansulfatproteoglykane (Compton et al., 1993). Diese Interaktion ermöglicht den nächsten Schritt, die spezifische Bindung von viralen Glykoproteinen an zelluläre Rezeptoren. Im Anschluss an die *Adsorption* erfolgt die *Penetration* durch Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Zielzelle in einem pH-unabhängigen Prozess (Compton et al., 1992), wodurch die nackten Nukleokapside in das Zytoplasma gelangen. Die eingeschleusten Kapside werden vermutlich analog zu Herpes Simplex-Virus 1 (HSV1) durch Dynein vermittelten Transport an den Mikrotubuli entlang zum Zellkern transportiert (Sodeik et al., 1997). Nach Bindung der Kapside an die Kernpore wird die Virus-DNA ins Nukleoplasma abgegeben (Ojala et al., 2000) und dort zirkularisiert. Die Transkription und Expression der viralen Gene verläuft kaskadenartig und wird in drei verschiedene Phasen unterteilt (Wathen und Stinski, 1982).

1. Phase: *Immediate-early (IE)* (0-3 h nach Infektion)

In dieser *sehr frühen Phase* erfolgt die durch zelluläre Transaktivatoren gesteuerte Transkription und Synthese regulatorischer Proteine, von denen einige zur Aktivierung der frühen Gene benötigt werden (Spaete & Mocarski, 1985; Geballe et al., 1986).

2. Phase: *Early (E)* (3-36 h nach Infektion)

Die *frühen (E) Produkte* werden zur Vorbereitung der Synthese von viralen Strukturkomponenten benötigt. In dieser Phase kommt es u. a. zur Induktion der viralen DNA-Polymerase, darüber hinaus wird die Synthese enzymatisch und regulatorisch wichtiger Proteine eingeleitet.

3. Phase: *Late (L)* (36-72 h nach Infektion)

Die *späte Phase* setzt mit dem Beginn der DNA-Replikation ein und dient der Bereitstellung von Strukturproteinen, den späteren Bestandteilen der Virionen.

Die Morphogenese der Tochtervirionen beginnt mit dem Zusammenbau der Kapside im Zellkern. Bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen infizierter Zellen können drei verschiedene Kapsidformen unterschieden werden, die A-, B- und C-Kapside. Die B-Kapside, die noch keine DNA enthalten, sind Vorläuferformen der A- und C-Kapside. Die ebenfalls DNA-freien A-Kapside entstehen durch Fehler bei der DNA-Verpackung, während die korrekte Verpackung von Genomeinheiten zur Bildung reifer C-Kapside führt. Dabei wird die konkatemere virale DNA, die nach dem „Rolling circle“ Mechanismus erzeugt wird (McVoy & Adler, 1994), vermutlich unter Beteiligung des Proteins p130 (pUL56), an den α -Sequenzen auf Genomgröße zurechtgeschnitten und in die Kapside verpackt (Bogner et al., 1998).

Durch einen Vorgang, der als *Transportknospung* bezeichnet wird, werden die Kapside aus dem Kern ins Cytoplasma transloziert (Radsak et al., 1989). Die Kapside gelangen durch diesen Knospungsprozess zunächst in die perinukleäre Zisterne, wobei sie eine temporäre, von der inneren Kernmembran abgeleitete Lipidhülle erhalten, die anschließend mit der äußeren Kernmembran fusioniert, so dass die nackten Nukleokapside ins Cytoplasma freigesetzt werden. Die endgültige Umhüllung findet an Zisternen des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) oder des frühen Endosoms statt (Tooze et al., 1993). Diese zweite Knospung, die sogenannte *Reifungsknospung*, führt zu Kapsiden mit doppelter Lipidhülle. Die äußere dieser Hüllen fusioniert im letzten Schritt der Exocytose mit der Plasmamembran der Wirtszelle, so dass reife, einfach umhüllte Virionen aus der Zelle freigesetzt werden.

1.3 Unterschiede zwischen attenuierten und wildtypischen(wt)-HCMV-Laborstämmen bzw. klinischen Isolaten

Für experimentelle Untersuchungen werden meist Laborstämme verwendet. Diese können in zwei Gruppen unterteilt werden. Eine Gruppe umfaßt attenuierte Stämme wie z.B. *AD169* und *Towne*, die in zahlreichen Passagen an humane Fibroblasten adaptiert wurden und für den Menschen nicht pathogen sind. Diesen Stämmen gegenüber stehen Laborstämme wie z.B. *Toledo*, die nach wenigen Zellkulturpassagen noch weitgehend wildtypische Eigenschaften aufweisen.

1.3.1 Virulenz und Zelltropismus

In klinischen Studien wurde gezeigt, dass die an Fibroblastenkulturen adaptierten HCMV-Stämme *AD169* (Elek & Stern, 1974) und *Towne* (Plotkin et al., 1976; Plotkin et al., 1984) im Patienten eine Serokonversion verursachen, die inapparent verlief. *Toledo* hingegen, verursachte bei Erwachsenen einen klinisch apparenten Krankheitsverlauf (Quinnan et al., 1984).

In vitro sind die Laborstämme *AD169*, *Towne* und der ebenfalls an Fibroblasten adaptierte Stamm *Davis* nur eingeschränkt fähig Endothelzellen zu infizieren. Der Stamm *Toledo* und das klinische Isolat *C1E* zeichnen sich dagegen durch einen Endothelzelltropismus aus. Dieser geht, wie gezeigt wurde, durch das Passagieren in Fibroblasten verloren, bleibt jedoch beim Passagieren in Endothelzellen erhalten (Mac Cormac & Grundy, 1999).

Mit zunehmender Passagezahl auf Fibroblasten scheint es also nicht nur zu einer Abnahme der Virulenz, sondern auch zu einer Veränderung im Zelltropismus zu kommen.

1.3.2 Molekulargenetische Unterschiede

Durch Reassoziationskinetiken (Huang et al., 1976; Pritchett, 1980), Southern Hybridisierung (Pritchett et al., 1980) und Restriktionsanalysen (Chandler & McDougal, 1986; Hayward et al., 1984) konnte gezeigt werden, dass die Genome attenuierter bzw. wildtypischer Laborstämme und klinischer Isolate große Homologien aber auch Unterschiede aufweisen (Tab. 4).

Interessanterweise ist bei dem Stamm *Toledo* und weiteren fünf klinischen Isolaten im UL/b'-Bereich (siehe Abb.3), je nach Isolat, ein 13-15 kb großes DNA-Fragment lokalisiert, welches in den an Fibroblasten adaptierten Stämmen *Towne* und *AD169* nicht nachweisbar ist und somit für die Vermehrung in Fibroblasten nicht von essentieller Bedeutung ist (Cha et al., 1996)(Tab.4). Andererseits besteht die Vorstellung, dass in dem zusätzlichen wildtypischen Genomabschnitt pathogenitätsrelevante Gene lokalisiert sein könnten. Aus den bisherigen Berichten lassen sich allerdings noch keine direkten Beweise für diese Vorstellung entnehmen.

Der HCMV-Stamm *Toledo* enthält in diesem Genabschnitt mindestens 19 zusätzliche ORFs („open reading frame“), die in Erweiterung der ORF-Nomenklatur von *AD169* als UL133-UL151 bezeichnet werden. Konsensus-Splice-Donor- oder Akzeptor-Sequenzen konnten nicht gefunden werden. Des weiteren deutet das Fehlen einer 1:1-Übereinstimmung von Transkriptionssignalsequenzen und ORFs auf unkonventionelle Transkriptionseinheiten hin (Cha et al., 1996).

Es konnte bisher für den 531 bp-umfassenden ORF UL144 aus diesem wildtypspezifischen Genomabschnitt gezeigt werden, dass er in Zellkultur exprimiert wird (Benedict et al., 1999; Lurain et al., 1999). Dieses potentielle Typ I-Transmembranglykoprotein ist ein Strukturhomolog des Herpes Simplex-Virus „entry mediators“ (HvE oder auch HVEM), der zu der Tumornekrosefaktorrezeptor (TNFR)-Familie gehört (Lurain et al., 1999). Bei niedrig passagierten Isolaten tritt im UL144-Gen eine hohe Variabilität der Nukleotid- und Aminosäuresequenz auf, so dass diese in drei größere phylogenetische Gruppen unterteilt wurden. Eine Korrelation zwischen diesen einzelnen Gruppen und der viralen Pathogenität war dabei nicht nachzuweisen (Lurain et al., 1999).

Aus der kodierenden Sequenz von 921 bp für den ORF UL142 des Stamms *Toledo*, der im Institut für Virologie, Marburg, untersucht wird, lässt sich ein aus 306 AS bestehendes potentiell Membranglykoprotein ableiten. Das Produkt weist 20 potentielle N-Glykosylierungsstellen und 5 Myristylierungsstellen auf (Cha et al., 1996).

Sequenzanalysen für die ORFs UL146 und UL147 deuten auf eine Ähnlichkeit zu α -Chemokinen hin (Penfold et al., 1999). Diese ORFs weisen eine ähnliche Sequenzvariabilität wie UL144 auf (Lurain et al., 1999).

Funktionell können virale Hüllmembranglykoproteine als Mediatoren bzw. Modulatoren der Infektion und Pathogenität eingeordnet werden.

	wt-HCMV z.B. <i>Toledo</i>	attenuierte Laborstämme z.B. <i>AD169</i>
19 ORFs in der Region UL 133-UL151	+	-
Infektion von Fibroblasten	+	+
Infektion von Endothelzellen	+	-
humanpathogen	+	-

Tab. 4: Unterschiede zwischen wt-HCMV- und attenuierten Laborstämmen

2 Zielsetzung

Die Aufgabe dieser Arbeit war es, zunächst den ORF UL142 des humanpathogenen Cytomegalievirus (HCMV) aus klinischen Isolaten im Hinblick auf einen eventuellen genetischen Polymorphismus mittels *nested* PCR und DNA-Sequenzierung hin zu untersuchen. Dabei sollten HCMV-Isolate zweier Patientengruppen, nämlich solche von Neugeborenen und von HIV-Positiven, verglichen werden.

Die strukturellen Analysen sollten vor dem Hintergrund der klinischen Daten anschließend ausgewertet werden, um mögliche Korrelationen zur spezifischen Pathogenität der Isolate zu eruieren.

3 Material

3.1 Bezugsquellen

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien stammen von den Firmen:

Boehringer-Bioproducts	Mannheim
Life Technologies	Eggenstein
Merck	Darmstadt
Riedel-de-Haen	Seelze
Roth	Karlsruhe
Serva	Heidelberg
Sigma	Deisenhofen

3.2 Chemikalien

Aceton	J.T. Baker/ Holland
Acrylamidlösung Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma, Deisenhofen
2-Amino-2-(hydromethyl)-propan-1,3-diol (Tris)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München
<i>aqua bidest</i>	Fresenius, Bad Homburg
Borsäure	Merck, Darmstadt
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase (X-Gal)	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglykol	Fluka, Neu-Ulm
Formamid	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Serva, Heidelberg

Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
N,N'-dimethyl-formamid	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Urea	Biorad, München

3.3 Antibiotika

Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Penicillin	Life Technologies, Karlsruhe
Streptomycin	Life Technologies, Karlsruhe

3.4 Kulturmediengrundstoffe

Bacto-Agar	Difco, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit
Bacto-Trypton	Difco, Detroit
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Life Technologies, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	BioWhittaker, Verviers, Belgien
L-Glutamin 200 mM (100x)	Life Technologies, Karlsruhe

3.5 Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs, Schwalbach und Roche, Mannheim, bezogen und den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt.

3.6 Sonstige Enzyme

AmpliTa [®] DNA-Polymerase	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
Proteinase K	Qiagen, Hilden

3.7 Sonstige Materialien

ABI PRISM [™] Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Alconox	Aldrich, Steinheim
DNA-Molecular Weight Marker	Roche, Mannheim; Life Technologies, Eggenstein
Eppendorf-Pipetten, -Spitzen und Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg American Can Company, Greenwich, USA
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
QIAgen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Spritzen und Kanülen	Braun, Melsungen
Sterilfilter (0,2 µm Porengröße)	Schleicher & Schuell, Dassel
Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer)	Beckman, München

Zellkulturflaschen/ Zellschaber

Schleicher & Schuell, Dassel
Greiner, Nürtingen

3.8 Geräte

ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer

Perkin Elmer, Norwalk, USA

Biofuge pico

Heraeus, Hanau

Biofuge 13

Heraeus Sepatech, Hanau

GeneAmp PCR System 2400

Perkin Elmer, Norwalk, USA

Minigelkammer, horizontal

Biorad, München

Photometer Gene Quant II

Pharmacia, Freiburg

RNA/DNA Calculator

Quarzküvette

Hellma, Mühlheim

Thermostat 5320

Eppendorf, Hamburg

Ultrazentrifuge L7-55/ L8-55M

Beckman, Frankfurt

UV-Lampe 2238 UV/CORD SII

LKB, Bromma, Schweden

Zentrifuge J2-21

Beckman, Frankfurt

Zentrifuge Rotina 48R

Hettich, Tuttlingen

3.9 Medien

Luria-Bertani Broth (LB-Medium)

Bacto-Hefe-Extrakt

0,50% (w/v)

Bacto-Trypton

1,00% (w/v)

Natriumchlorid

1,00% (w/v)

Magnesiumsulfat-Heptahydrat

0,25% (w/v)

*ad aqua bidest**LB^{amp}-Medium*

Ampicillin

0,10 mg/l

LB-Medium

LB-Agar^{amp/IPTG/X-Gal}

LB-Medium

Bacto-Agar	1,50 % (w/v)
Ampicillin	0,10 mg/l
IPTG	0,50 M
X-Gal	80,00 mg/l

DMEM Kulturmedium

Dulbecco's MEM (1x)	500,00 ml
L-Glutamin, 200mM (100x)	5,00 ml
Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml, 5,0 mg/ml)	5,00 ml
Foetales Kälberserum	50,00 ml

3.10 Puffer*PBS- Puffer (pH 7,4)*

di-Natriumhydrogenphosphat	19,00 mM
Kaliumhydrogenphosphat	2,20 mM
Natriumchlorid	0,20 mM
<i>ad aqua bidest</i>	

TAE-Puffer (50x)

Tris	2000,00 mM
EDTA	50,00 mM
Eisessig	5,71 % (v/v)
<i>ad aqua bidest</i>	

TBE-Puffer (10x)

Tris	900,00 mM
------	-----------

Borsäure	900,00 mM
----------	-----------

EDTA	10,00 mM
------	----------

ad aqua bidest

3.11 Zellen

3.11.1 Primäre humane Hautfibroblasten (HF)

OP-Präparate humaner Vorhäute wurden aus der Praxis von Dr. A. v. Keitz in Marburg erhalten und in Kultur gebracht. Für die Versuche wurden HF zwischen der 5. und der 20. Passage verwendet.

3.12 Virusstämme

3.12.1 Laborstämme

Laborstamm AD 169	(Gupta et al., 1977)
-------------------	----------------------

Toledo	(Quinnan et al., 1984)
--------	------------------------

UlmCMV	Prof. Dr. Th. Mertens, Ulm
--------	----------------------------

3.12.2 Patientenisolat aus Urin

Die HCMV-Isolate von HIV-positiven Patienten wurden von Herrn Dr. Rabenau, Frankfurt, die Isolate der Neugeborenen vom Labor Prof. Enders, Stuttgart, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Es wurden ebenfalls HCMV-Isolate von Neugeborenen aus Marburg untersucht (s. Tab. 5).

	Krankheit und Zeitpunkt der Infektion	Therapie	Symptomatik
Frankfurt (Isolate von HIV-Patienten)			
F2	?	?	k. A.
F3	HIV-pos. seit 1994	GCV	k. A.
F38	HIV-pos. seit 1996	?	/
F39	HIV-pos. seit 1996	GCV	k. A.
F40	HIV-pos. seit 1993	keine	/
F59	HIV-pos. seit 1986	GCV, PFA, HPMPC	Herpes genitalis, Hep. A und B
F63	HIV-pos. seit 1986	GCV, PFA, HPMPC	k. A.
F70	HIV-pos. seit 1986	GCV	k. A.
F72	HIV-pos. seit 1994	GCV	keine
F73	HIV-pos. seit 1989	GCV?	/
F75	HIV-pos. seit 1989	GCV	Herpes simplex II
F85	HIV-pos. seit 1996	GCV	k. A.
F97	HIV-pos. seit 1988	GCV	k. A.
Stuttgart (Isolate von Neugeborenen)			
S279	symptomatisch/ pränatal	?	Mikrozephalie, Hydrozephalus internus, Petechien, Anämie, Thrombopenie, Hepatomegalie, Hypotrophie
S666	asymptomatisch/ pränatal	?	Kind klinisch unauffällig
S889	symptomatisch/ pränatal	?	Seit 3. Lebenstag rezid. Cerebr. Krampfanfälle, Augen und Ohren o.B., Leber und Milz o.B., Keine Verkalkungen
S136	symptomatisch/ frühpostnatal	?	Frühgeburt, intracerebrale Blutung (zu diesem Zeitpunkt Urin noch CMV-negativ)
S691	frühpostnatal	?	/
S868	frühpostnatal	?	/
S048	?/ frühpostnatal	?	Keine Angaben erhalten
S213	erst asymptomatisch/ frühpostnatal	?	Reifgeboren, bei Geburt klinisch o.B., wurde gestillt, mit 6 Mon. Unklare Bewußtlosigkeit, Hypoglykämie
S896	symptomatisch?/ pränatal	?	Sectio bei patholog. CTG, Geburtsgewicht 2640g, hypotroph, Keine Hepatosplenomegalie, kein Ikterus

	Krankheit und Zeitpunkt der Infektion	Therapie	Symptomatik
<u>Stuttgart</u> (Isolate von Neugeborenen)			
S865	U3 auffällig/ frühpostnatal	GCV	Bei Geburt o.B., vollgestillt, bei U3 (mit 6Wochen) auffällig: dilat. Kardiomyopathie, Myokarditis
S695	symptomatisch/ pränatal	?	Reifgeboren, Thrombopenie, kleinfleckiges Exanthem, Augen o.B., Schädel-Sono o.B., Pneumonie, wurde gestillt
S049	?/ frühpostnatal	?	k. A.
S054	asymptomatisch/ kongenital	k.A.	k. A.
S066	symptomatisch/ kongenital	k.A.	k. A.
S332	asymptomatisch/ kongenital	k.A.	k. A.
S333	asymptomatisch/ kongenital	k.A.	k. A.
S342	asymptomatisch/ kongenital	k.A.	k. A.
S478	asymptomatisch/ kongenital	k.A.	k. A.
S480	asymptomatisch/ kongenital	k.A.	k. A.
S527	symptomatisch/ kongenital	k.A.	k. A.
S567	symptomatisch/ kongenital	k.A.	k. A.
S627	symptomatisch/ kongenital	k.A.	k. A.
S629	symptomatisch/ kongenital	k.A.	k. A.
S777	asymptomatisch/ kongenital	k.A.	k. A.
S891	asymptomatisch??/ kongenital	k.A.	k. A.

	Krankheit und Zeitpunkt der Infektion	Therapie	Symptomatik
Stuttgart (Isolate von Neugeborenen)			
S922	symptomatisch/ kongenital	k.A.	k. A.
Marburg (Isolate von Neugeborenen)			
Dem	?/ kongenital	GCV	Neonatale Hepatitis, Lebersynthesestörung, Hepatosplenomegalie, gastrointestinale Blutung, Sepsis
Gatt	?	?	k. A.

Tab. 5: **Untersuchte Patientenisolat** (k. A.- keine Angaben erhalten, ?- nicht geklärt, GCV- Ganciclovir, HPMP- Cidofovir, PFA- Foscarnet)

3.13 Bakterienstämme

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden ausschließlich *Escherichia coli* K-12-Stämme verwendet.

3.13.1 *E. coli* XL1-Blue

Genotyp: *supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac⁻, F⁻*

[proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15, Tn10(tet^r)]

(Bullock et al., 1987)

3.13.2 *E. coli* JM109

Genotyp: *endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺), relA1, supE44,*

Δ(lac-proAB), [F⁺, traD36, proAB, lacI^qZΔM15]

(Yanisch-Perron et al., 1985)

3.14 Plasmid

Plasmide sind zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle, die unabhängig vom bakteriellen Genom in Bakterien repliziert werden. Sie enthalten einen Replikationsstart (origin of replication, ori), ein Selektionsgen (meist ein Antibiotikaresistenzgen) und eine Klonierungsstelle (cloning site), in die fremde DNA eingeschleust werden kann. Dies ermöglicht die Vervielfältigung des eingefügten DNA-Fragmentes.

3.14.1 Der Vektor pGEM[®]-T

Der Vektor pGEM[®]-T (Abb.4) wurde von der Firma Promega, Mannheim, bezogen. Der etwa 3 kb große Vektor ermöglicht über einen 3'-Thymidinüberhang, der sich stromaufwärts und stromabwärts der Polylinkerregion befindet, die direkte Klonierung von PCR-Amplifikaten, die an ihren 3'-Enden einzelne Desoxyadenosine tragen. Die Polylinkerregion befindet sich in der α -Peptid-kodierenden Region der β -Galaktosidase (lacZ), welche alleine keine β -Galaktosidase-Aktivität besitzt. Hierdurch wird eine Blau-Weiß-Selektion, die auf einer Unterbrechung des lacZ-Gens beruht, in α -komplementierenden *E.coli*-Zellen ermöglicht. Die Polylinkerregion wird durch den T7- und den Sp6-RNA-Polymerase Promotor flankiert. Ferner verfügt der Vektor über einen ori des filamentösen Phagen f1 (f1 ori), der zur Präparation einzelsträngiger DNA genutzt werden kann (Abb.4).

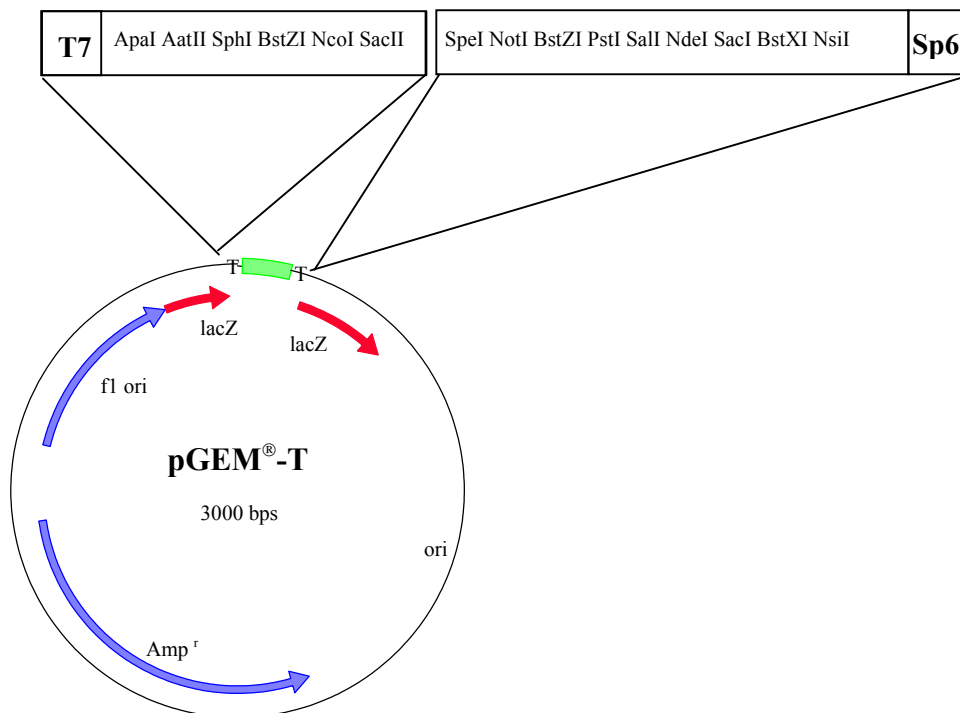


Abb.4: Schematische Darstellung des Vektors pGEM®-T

Dargestellt ist der ori zur Amplifikation in E.coli-Zellen (ori), das β -Laktamase Gen (AMP^r), das lacZ-Gen, sowie die Polylinkerregion mit Thymidin-Überhang (T). Die Polylinkerregion ist vergrößert dargestellt.

3.15 Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) und Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe) bezogen und sowohl für Sequenzierreaktionen als auch für Polymerasekettenreaktionen eingesetzt. Die Nummerierung der Oligonukleotide, die im HCMV-Genom binden, orientiert sich an der publizierten Sequenz des HCMV Toledo-Genoms (Cha et al., 1996). Die Nummerierung der Oligonukleotide des Vektors beginnt mit dem ersten Nukleotid der Vektorkarte.

3.15.1 Oligonukleotide für die Sequenzierung

<u>Bezeichnung</u>		<u>Sequenz 5'-3'</u>
<u>Nukleotidposition</u>		
T7 Promotor	GTAATACGACTCACTATAGGGC	2984-3 (pGEM [®] -T)
Sp6 Promotor	GATTTAGGTGACACTATAG	124-143 (pGEM [®] -T)
Seq-rück	GTCACGTTATGTGTGTCG	7196-79 (Toledo)
in hin	CGGTAGGAATCAGTTCGTCTT	6620-40 (Toledo)
in rück	ACGGCGTCTGTACAGTATGGC	7171-51 (Toledo)

Tab. 6: Oligonukleotide für die Sequenzierung

3.15.2 Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion (PCR)

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz 5'-3'</u>	<u>Nukleotidposition</u>
Hin	ATGCGGATTGAATGGGTGTG	6448-67 (Toledo)
Rück	TTACTGACCGCGCCATACCTC	7368-48 (Toledo)
in hin	CGGTAGGAATCAGTTCGTCTT	6620-40 (Toledo)
in rück	ACGGCGTCTGTACAGTATGGC	7171-51 (Toledo)
ex hin	TGTTAAAAAATGCAGTGTGTGAAG	6403-26 (Toledo)
ex rück	GTGTTTCGAGGATCGTGGGG	7414-396 (Toledo)

Tab. 7: Oligonukleotide für die PCR

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung humaner Fibroblasten

Die Kultivierung der primären Vorhautfibroblasten (HF), die aus Säuglingspräputien gewonnen wurden, erfolgte in „Dulbeccos Modified Eagles Medium“ (DMEM, Life Technologies), dem 10% fötales Kälberserum (FCS, BioWhitaker), 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde, bei konstanter Temperatur von 37°C, bei 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit. Im konfluenten Stadium enthielten die verwendeten 75 cm²-Zellkulturflaschen ca. 6×10^6 Zellen. Zum Passagieren der Zellen wurden die konfluent gewachsenen Monolayer nach Entfernung des Kulturmediums einmal mit einer auf 37°C erwärmten Trypsin/EDTA-Lösung (Life Technologies, Eggenstein) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation in Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C abgelöst und im Verhältnis 1:3 auf mit DMEM-Kulturmedium versehene Kulturflaschen verteilt.

<i>DMEM-Kulturmedium</i>	siehe 3.9
--------------------------	-----------

Trypsin/EDTA-Lösung

Trypsin, 0,25% (w/v)	20,00 ml
EDTA-Lösung	80,00 ml

EDTA-Lösung

EDTA-NA ₂	0,50 mM
Natriumchlorid	0,14 mM
Kaliumchlorid	0,26 mM
di-Natriumhydrogenphosphat	6,50 mM
Kaliumhydrogenphosphat	1,50 mM

4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellkulturen wurden diese kurz vor Erreichen der Konfluenz mit Trypsin/EDTA- Lösung abgelöst (siehe 4.1.1). Das Trypsin wurde durch Zugabe von 3 ml FCS (BioWhitaker) inaktiviert und die Zellen bei 750 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur sedimentiert (Rotina 48R). Das Zellsediment wurde in eiskaltem DMEM mit 40% FCS aufgenommen (1 ml / 5×10^6 Zellen) und mit dem gleichen Volumen eiskaltem DMEM mit 20% Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Die Zellsuspension wurde in 1 ml Aliquots (je $2,5 \times 10^6$ Zellen) in Polypropylen- Röhrchen gefüllt und zunächst für 24 h bei -80°C eingefroren. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt.

Eingefrorene Zellen wurden im 37°C Wasserbad aufgetaut und sofort in eine 25 cm^2 - Zellkulturflasche mit 5 ml DMEM mit 10% FCS überführt. 24 h nach dem Aussäen der Zellen wurde das Kulturmedium gewechselt, da das enthaltene DMSO bei Erwärmung toxisch auf die Zellen wirkt.

4.1.3 Virusanzüchtung aus Patientenproben (Urin)

2,5 ml der erhaltenen Urinprobe wurden bei 3500 rpm für 10 min zentrifugiert. Der größte Teil des Überstandes wurde direkt auf HFF in 6-wells mit Deckgläsern gegeben. Das Sediment wurde im Rest-Überstand resuspendiert und ebenfalls auf die Zellen gegeben (siehe 4.1.4).

4.1.4 Herstellung von Virusstocks und Virustitration

Zur Herstellung von Virusstocks wurden konfluente Monolayer humaner Vorhautfibroblasten in 175 cm^2 -Kulturflaschen verwendet. Die Zellen wurden nach Entfernung des Kulturmediums einmal mit PBS (siehe 3.10) gewaschen und anschließend mit einer „multiplicity of infection“ (m.o.i.) von 0,1 infiziert. Nach Zugabe von Virussuspension in 10 ml DMEM-Kulturmedium ohne FCS

und Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch wurde nicht adsorbiertes Virus abgenommen und die Zellen mit 30 ml DMEM-Kulturmedium und 2% FCS bei 37°C inkubiert. Zu dem Zeitpunkt, an dem die Hälfte der Zellen einen deutlichen cytopathischen Effekt aufwiesen, wurde das Medium erneut gewechselt, das Medienvolumen dabei auf 25 ml verringert. Nach weiteren fünf bis sechs Tagen wurde der Kulturüberstand geerntet und durch niedertourige Zentrifugation für 10 Minuten bei 3500 rpm von Zellbestandteilen getrennt (Rotina 48R). Der zellfreie virushaltige Überstand wurde aliquotiert und bei –80°C eingefroren.

Um die Anzahl der infektiösen Einheiten des virushaltigen Kulturüberstandes zu bestimmen, wurde eine doppelte logarithmische Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-6} in Kulturmedium) hergestellt. Mit den Verdünnungen wurden konfluente Deckglaskulturen von Fibroblasten infiziert und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Ermittlung des Virustiters erfolgte durch den Nachweis von HCMV- IE-Virusantigen mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung eines monoklonalen anti- IE Antikörpers (mab IE). Die durchschnittliche Anzahl der infektiösen Einheiten der Stammsuspension (n) ermittelt sich aus der letzten Verdünnung (10^{-x}), in der noch einige wenige Kerne (y) in der Immunfluoreszenz positiv sind nach der Formel: $n = y \cdot 10^x$.

DMEM-Kulturmedium

siehe 3.9

4.2 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, entsprechen die in der Arbeit angewendeten Methoden den Standardverfahren nach Sambrook et al., 1989.

4.2.1 DNA-Extraktion aus Patientenisolaten mit QIAamp DNA Mini Kit

Die DNA-Extraktion aus HCMV-infizierten Zellen erfolgte in Anlehnung an das vom Hersteller vorgegebene „tissue protocol“.

Zur Lysis wurden zunächst 200 µl der virushaltigen Probe mit 20 µl Proteinase K durch kurzes Zentrifugieren gemischt. Anschließend wurden 200 µl des Puffers AL hinzugefügt, gevortext und nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 70°C kurz zentrifugiert. Es erfolgte das Versetzen auf dem Vortexer mit 200 µl Ethanol (96%). Das Gemisch wurde auf die vom Hersteller gelieferte QIAamp-Säule gegeben und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert, wobei eine Bindung der DNA an das Silika-Gel stattfand. Es erfolgte anschließend das Waschen in zwei Schritten, um verbliebende Restkontaminationen gründlich zu entfernen. Zunächst wurde 500 µl des AW1 Puffers auf die Säule gegeben und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde 500 µl des AW2 Puffers verwendet und bei 14000 rpm für 3 min zentrifugiert. Die DNA wurde mit 200 µl Elutionspuffer AE nach einer Inkubationszeit von 1 min bei Raumtemperatur bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert und somit eluiert. Die Aufbewahrung der DNA erfolgte bei 4°C.

Puffer AE (pH 9,0)

Tris-Cl	10,0 mM
EDTA	0,5 mM

Die Bestandteile der Puffer AL, AW1 und AW2 werden vom Hersteller nicht näher erläutert.

4.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Abschnitten

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht eine spezifische, exponentielle Amplifikation eines definierten DNA-Abschnittes mit Hilfe zweier antiparallel hybridisierender Oligonukleotide (Mullis und Faloona, 1987). Verwendet wird dabei eine thermostabile DNA-Polymerase, so dass bei einer zyklischen Abfolge geeigneter Temperaturen die thermische Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Oligonukleotide mit der DNA-Matritze und die Kettenverlängerung sowie Amplifikation erfolgen kann.

4.2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurden 4 bis 50 ng Matrizen-DNA in einem Volumen von 25 µl eingesetzt. Diese Probe wurde mit 25 µl Reaktionsgemisch vermischt und zur Amplifikation in 200 µl-Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400) inkubiert. Zur vollständigen Denaturierung wurde der Ansatz zu Beginn des Amplifikationszyklus für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend begann der Reaktionszyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation, der 35 mal wiederholt wurde.

Reaktionszyklus:

- | | | |
|--------------------|--------------------------|------------|
| 1. Denaturierung: | 95°C | für 30 sec |
| 2. Hybridisierung: | 52-54°C | für 30 sec |
| | (je nach Oligonukleotid) | |
| 3. Polymerisation: | 72°C | für 60 sec |

Der Reaktionszyklus wurde 35mal durchgeführt.

Eine abschließende fünfminütige Inkubation bei 72°C gewährleistete, dass die Amplifikate vervollständigt wurden, bevor die Reaktion beendet und das Reaktionsgefäß auf 4°C abgekühlt wurde. Die Analyse der PCR-Amplifikate erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese (siehe 4.2.3)

Reaktionsgemisch

<i>Komponenten</i>	<i>Endkonzentration</i>
10-fach PCR-Puffer	1x
dATP	200 µM
dCTP	200 µM
dGTP	200 µM
dTTP	200 µM
Oligonukleotid 1	0,1-1 µM
Oligonukleotid 2	0,1-1 µM
AmpliTa [®] q DNA-Polymerase	2,5 Einheiten
<i>ad 25 µl aqua bidest</i>	

4.2.2.2 nested PCR

Zur Steigerung der Produktspezifität werden in der *nested* PCR zwei aufeinanderfolgende Amplifikationen durchgeführt (Abb. 5). In der ersten Vervielfältigung werden Oligonukleotide (*externe*) eingesetzt (A), die das gewünschte Amplifikat eingrenzen. Anschließend wird das erste PCR-Produkt (B) für eine weitere Amplifikation als Matrize eingesetzt, wobei ein *internes* Oligonukleotidpaar zur Anwendung kommt (C).

Der Vorteil der *nested* PCR liegt zum einen darin, dass lineare und proteinfreie DNA-Fragmente für die Amplifikation eingesetzt werden, da supercoiled Matrizen sich teilweise nicht zu 100% denaturieren lassen oder genomische DNA selbst bei sehr effektiver Reinigung noch mit Histonen assoziiert ist (Müller, HJ, 2001). Zum anderen wird die Spezifität und Effektivität des PCR-Verfahrens potenziert. In dieser Arbeit wurde die *nested* PCR verwendet, um erste Hinweise auf eine genetische Variabilität aufzuzeigen.

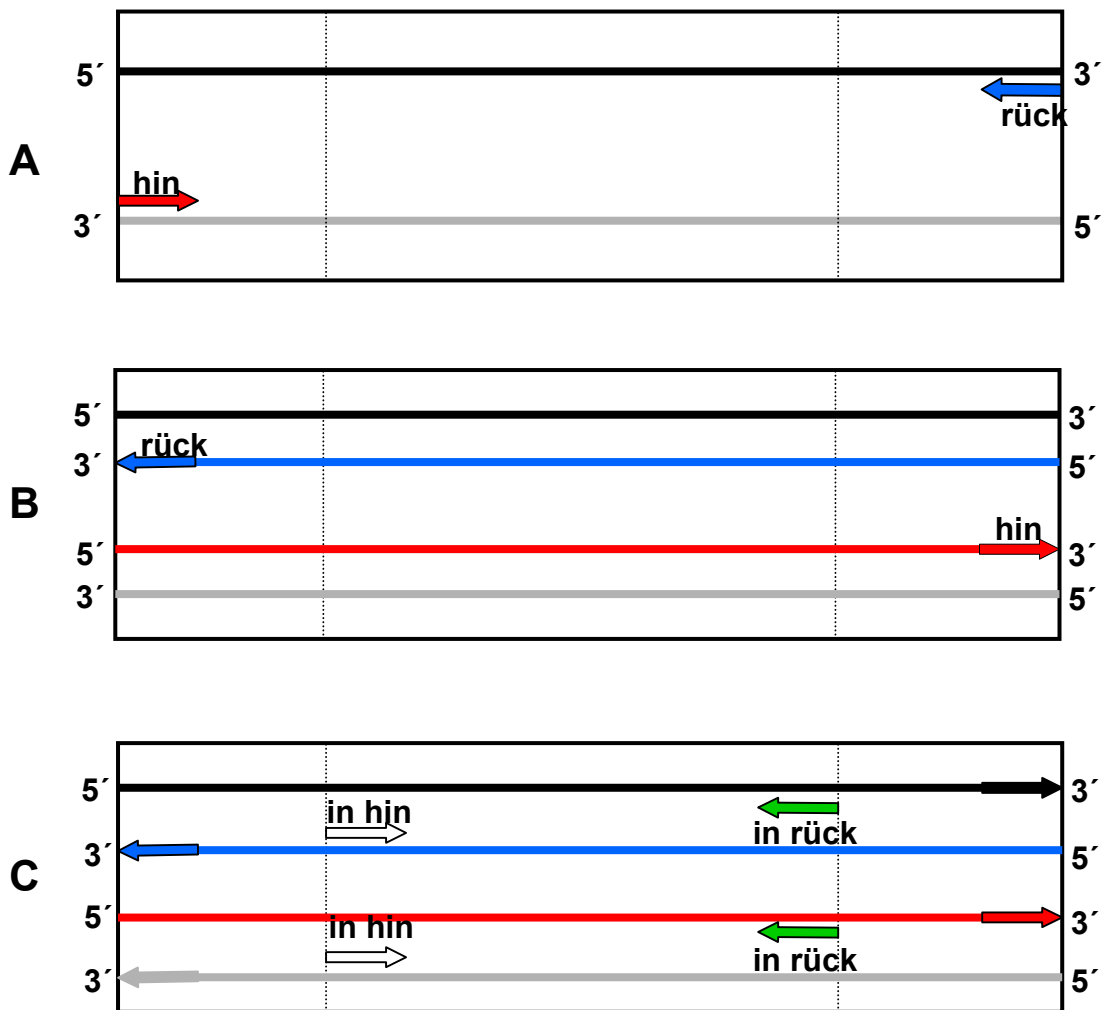


Abb. 5: **Schematische Darstellung der *nested* PCR**

- A- Externe Oligonukleotide (rote/ blaue Pfeile) bestimmen die Größe des ersten Amplifikates.
- B- Nach den ersten Amplifikationsschritten entstehen Amplikate, die den gewünschten Bereich umfassen (rot und blau).
- C- Die spezifischen internen Oligonukleotide (weiße und grüne Pfeile) werden im zweiten Amplifikationsschritt verwendet, so dass das gewünschte Amplikat in den nächsten Zyklen synthetisiert wird.

Mit dem Ansatz der ersten PCR, in der externe Oligonukleotide zur Anwendung kamen, wurde eine zweite Reaktion mit internen Oligonukleotiden durchgeführt, die im inneren Bereich des erwarteten Amplifikates binden sollten. Es wurden 10 µl des Amplifikatproduktes der ersten PCR eingesetzt. Diese wurden mit 40 µl Reaktionsgemisch in ein 200 µl Reaktionsgefäß gegeben und in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400) inkubiert. Zur vollständigen Denaturierung wurde der Ansatz zu Beginn des Amplifikationszyklus für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend begann der folgende Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation, der 30mal wiederholt wurde.

Reaktionszyklus:

- | | | |
|--------------------|--------------------------|------------|
| 1. Denaturierung: | 95°C | für 30 sec |
| 2. Hybridisierung: | 52-54°C | für 30 sec |
| | (je nach Oligonukleotid) | |
| 3. Polymerisation: | 72°C | für 60 sec |

der Reaktionszyklus wurde 30 mal durchgeführt.

Eine abschließende fünfminütige Inkubation bei 72°C gewährleistete, dass die Amplifikate vervollständigt wurden, bevor die Reaktion beendet und das Reaktionsgefäß auf 4°C abgekühlt wurde. Die Analyse der PCR-Amplifikate erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese (siehe 4.2.3).

Reaktionsgemisch

<i>Komponenten</i>	<i>Endkonzentration</i>
10-fach PCR-Puffer	1x
dATP	200 µM
dCTP	200 µM
dGTP	200 µM
dTTP	200 µM
Oligonukleotid „in hin“	0,1-1 µM
Oligonukleotid „in rück“	0,1-1 µM
AmpliTa [®] q DNA-Polymerase	2,5 Einheiten
<i>ad 40 µl aqua bideest</i>	

4.2.3 Agarosegel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung wurde zur Identifizierung der PCR-Amplifikate eingesetzt. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 1-2% Agarosegele in 1x TAE-Puffer verwendet. Die Proben sowie 0,25 µg eines DNA-Längenstandards (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt, aufgetragen und in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Minigelkammer, Biorad) in 1x TAE-Puffer bei einer Spannung von 8V/cm Elektrodenabstand elektrophoretisch aufgetrennt. Um die

DNA-Fragmente unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) darstellen zu können, wurde den Agarosegelen Ethidiumbromid als DNA-interkalierendes Agens in einer Konzentration von $0,15 \text{ } \mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Das erhaltene Bandenmuster wurde photographisch dokumentiert.

4.2.4 Reinigung von PCR-Produkten

Zur Entfernung von Enzym, Oligonukleotiden und Salzen aus abgeschlossenen PCR-Reaktionsansätzen wurde der "QIAquick PCR Purification Kit" entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurde der Ansatz mit dem fünffachen Volumen Puffer PB vermischt, durch Zentrifugation für 60 Sekunden bei 13000 rpm (Biofuge pico) an die Silicamembran einer Säule gebunden und zweimal mit $750 \text{ } \mu\text{l}$ Puffer PE für 60 Sekunden bei 13000 rpm gewaschen. Die Elution erfolgte mit $30 \text{ } \mu\text{l}$ Elutionspuffer EB (10mM Tris-Cl, pH 8,5).

Das Eluat wurde bei 4°C gelagert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde in der Ligation eingesetzt.

Die Bestandteile der Puffer PB und PE werden vom Hersteller nicht näher erläutert.

4.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation linearisierter Vektor-DNA und Insert-DNA erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase, welche unter ATP-Verbrauch die Verbindung von 3'-Hydroxylgruppen mit 5'-Phosphatgruppen katalysiert. Die linearisierte Vektor-DNA wurde in einem molaren Verhältnis von 1:10 zur Insert-DNA in die Ligrationsreaktion eingesetzt.

In einem Gesamtvolumen von $10 \text{ } \mu\text{l}$ wurden ca. 50 ng Vektor-DNA, mit einer entsprechenden Menge Insert-DNA, 1 mM ATP, $5 \text{ } \mu\text{l}$ 2-fach Ligasepuffer und 3 Einheiten T4-DNA-Ligase (Promega, Madison, USA) inkubiert. Die Ligation fand bei 4°C über Nacht bzw. 60 min bei RT statt.

4.2.6 Transformation von *E. coli*

4.2.6.1 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Transformation mittels Hitzeschock wurden 100 ml einer Bakterienkultur in LB-Medium auf einem Schüttler bei 37°C bis zu einer Dichte von etwa 10^8 Zellen/ml inkubiert. Die Zellen wurden nach 20-minütiger Inkubation auf Eis bei 2600 rpm für 10 min sedimentiert (Rotina 48R) und in 10 ml TSS-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis konnten die Zellen für die Transformation eingesetzt werden.

LB-Medium

siehe 3.9

TSS-Puffer (pH 6,5)

LB-Medium

85,00 % (v/v)

Polyethylenglykol 800

10,00 % (w/v)

DMSO

5,00 % (w/v)

Magnesiumchlorid

50,00 mM

ad aqua bideest

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6,5 eingestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert.

4.2.6.2 Transformation

Für die Transformation wurden 100-200 µl der kompetenten Bakterien mit 10 µl des Ligationsansatzes vermischt. Eine Inkubation für 30 min auf Eis ermöglichte die Anlagerung der DNA an die Bakterienzellwand. Die Aufnahme der DNA erfolgte bei einem Hitzeschock von 42 °C für 2 min. Nach 2 min Abkühlung auf Eis wurde der Transformationsansatz mit 800 µl LB-Medium vermischt und für 30 min bei 37°C zur Expression der plasmidkodierten β-Lactamase (Ampicillin-resistenz) inkubiert. Zur Blau-Weiß-Selektion plasmidtragender Klone (s. 3.14.1) wurden 100 und 800/ 900 µl des Ansatzes auf Agarplatten (mit Ampicillin, IPTG und X-Gal) ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

LacZ α kodiert für das N-terminale α -Fragment der β -Galaktosidase, das alleine keine β -Galaktosidase-Aktivität besitzt. Nach Inkubation mit Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und X-Gal bleiben α -komplementierende Bakterienkolonien weiß, in denen das LacZ-Gen durch die Insertion eines DNA-Fragments zerstört ist, während Klone ohne Insertion das α -Fragment exprimieren und sich blau färben.

LB-Medium siehe 3.9

LB-Agar^{amp}/IPTG/X-Gal

LB-Agar	siehe 3.9.
Ampicillin	0,10 mg/l
IPTG	0,50 M
X-Gal	80,00 mg/ml

4.2.7 Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

4.2.7.1 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA im kleinen Maßstab

Zur Isolierung von bis zu 20 μ g Plasmid-DNA wurde der "QIAprep Spin Kit" der Firma Qiagen verwendet.

1,5 ml einer über Nacht auf dem Schüttler bei 37°C in LB-Medium^{amp} gewachsenen Bakterien-Kultur wurden bei Raumtemperatur 5 min bei 13000 rpm (Bio-fuge 13) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Bakterien in 250 μ l Puffer P1/RNase (0,1 mg/ml) resuspendiert. Das Auflösen der Zellmembranen und die Denaturierung der DNA erfolgte durch Zugabe von 250 μ l Puffer P2. Durch Zugabe von 350 μ l Puffer N3 wurde die Plasmid-DNA renaturiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm konnte der plasmidhaltige Überstand auf eine Silicagel-Membran gegeben werden. Die Bindung der DNA an die Matrix sowie das Waschen der Säule mit 750 μ l Puffer PE erfolgte durch einminütige Zentrifugation der Flüssigkeiten bei 13000 rpm durch die Säule.

Nach erneuter Zentrifugation zur Entfernung des restlichen Waschpuffers konnte die DNA mit 50 µl Elutionspuffer EB eluiert werden.

Die DNA ist für einige Tage bei 4°C, für längere Zeit bei -20°C lagerfähig.

4.2.7.2 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA im großen Maßstab

Für die Gewinnung großer DNA-Mengen wurde der "QIAgen Filter Plasmid Maxi Kit" der Firma Qiagen verwendet.

Bakterien einer über Nacht in 500 ml LB-Medium^{amp} gezogenen Kultur wurden 15 min im JA10-Rotor einer Beckman-Ultrazentrifuge bei 5000 rpm und 4°C pelletiert. Nach Abdekantieren des Überstands erfolgte die Resuspension der Bakterien in 10 ml Puffer P1. Die Suspension wurde zur Lyse vorsichtig mit 10 ml Puffer P2 vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Puffer P3 abgestoppt und das Lysat in eine "QIAFilter"-Spritze überführt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur sammelten sich die Zelltrümmer an der Oberfläche, so dass die plasmidhaltige Lösung durch den sich in der Spritze befindlichen Filter auf eine zuvor mit 10 ml QBT equilibrierte "Qiagen 500"-Säule überführt werden konnte. Nach Bindung der DNA an die Säule wurde diese zweimal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen und mit 15 ml Puffer QF direkt in ein SW28-Polyallomer-Zentrifugenröhrchen eluiert. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol wurde die DNA gefällt und für 30 min bei 13000 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 1,5 ml eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und die DNA nach Lufttrocknung in 300 µl Puffer EB aufgenommen. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

LB-Medium^{amp}

siehe 3.9

Puffer P1 (pH 8,0)

Tris/HCl	50,00 mM
EDTA	10,00 mM
RNase	400,00 µg/ml

Puffer P2

Natriumhydroxid	200,00 mM
SDS	1,00 % (w/v)

Puffer P3 (pH 4,8)

Kaliumacetat	255,00 mM
--------------	-----------

Puffer QBT (pH 7,0)

Natriumchlorid	750,00 mM
MOPS	50,00 mM
Ethanol	15,00 % (v/v)

Puffer QC (pH 7,0)

Natriumchlorid	1000,00 mM
MOPS	50,00 mM
Ethanol	15,00 % (v/v)

Puffer QF (pH 8,0)

Natriumchlorid	1200,00 mM
MOPS	50,00 mM
Ethanol	15,00 % (v/v)

Puffer EB

Tris-Cl, pH 8,5	10,00 mM
-----------------	----------

Die Bestandteile der Puffer N3, PB und PE werden vom Hersteller nicht näher erläutert.

4.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch, wobei die Extinktion bei $\lambda=260$ nm gemessen wurde. Hierbei gilt die einfache Beziehung:

$OD_{260\text{ nm}} = 1,0$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA bei 1 cm Lichtweg (Sambrook et al., 1989).

4.2.9 Analytische Restriktion von DNA

Für die analytischen Restriktionen wurden 0,2 bis 1 μg Plasmid- DNA mit 1 μl 10-fach konzentriertem Inkubationspuffer sowie 1 bis 5 Einheiten des entsprechenden Enzyms mit *aqua bideest* auf ein Gesamtvolumen von 10 μl eingestellt und bei 37°C für 90 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Analyse (s. 4.2.3).

4.2.10 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde der ABI PRISMtm Dye Terminator Cycle Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Norwalk, USA) verwendet.

4.2.10.1 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktion basiert auf Verlängerung eines zum Matrizen-Strang komplementären Oligonukleotids und Kettenabbruch mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden. Die vier verschiedenen Didesoxynukleotide (dTTP, dATP, dCTP, dTTP) sind dabei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass die zu sequenzierende Probe in einer „Spur“ gelelektrophoretisch aufgetrennt werden kann. Für die Sequenzierreaktion wurden DNA-Mengen von 0,5-1,5 μg eingesetzt. Die Matrizen-DNA wurde zu 10 pmol des Oligonukleotids

(s. 3.15.1) in wässriger Lösung und 4 µl des „Terminator Cycle Ready Reaction Mix“, der den Reaktionspuffer mit Polymerase, die Nukleotide dITP, dATP, dCTP, dTTP und deren fluoreszenzmarkierte Didesoxyanaloga bereits enthielt, gegeben. Der Ansatz wurde mit *aqua bidest* auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Die Sequenzierreaktion erfolgte in einem GeneAmp PCR System 2400-Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA). Das Programm umfaßte 25 Zyklen, die aus drei Phasen bestanden.

Reaktionszyklus:

- | | | |
|--------------------|--------------------------|-----------|
| 1. Denaturierung: | 96°C | für 30 s |
| 2. Hybridisierung: | 50-53°C | für 30 s |
| | (je nach Oligonukleotid) | |
| 3. Polymerisation: | 60°C | für 4 min |

Der Reaktionszyklus wurde 25 mal durchgeführt.

Eine abschließende fünfminütige Inkubation bei 60°C gewährleistete, dass die Amplifikate vervollständigt wurden, bevor die Reaktion beendet und das Reaktionsgefäß auf 4°C abgekühlt wurde.

4.2.10.2 Aufreinigung der Sequenzieransätze

Nach Abschluss der Reaktion wurde die Probe mit *aqua bidest* auf 100 µl Gesamtvolumen gebracht und die DNA durch Zugabe von einem zehntel Volumenteil 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und zweieinhalb Volumenteilen Ethanol (96%) präzipitiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm (Biofuge pico, Heraeus). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das DNA-Sediment wurde mit 1 ml Ethanol (70%) gewaschen und die DNA anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 4 µl Sequenzierproben-Puffer resuspendiert. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurde die DNA für 5 min bei 95°C denaturiert.

Sequenzierproben-Puffer

Formamid	80,00 (w/v)
Dextranblau	1,00 (w/v)
EDTA	5,00 mM
<i>ad aqua bidest</i>	

4.2.10.3 Sequenziergel und Elektrophorese

Nach sorgfältiger Reinigung der Glasplatten des Elektrophoresesystems (ABI PRISMtm 377 DNA Sequencer, Perkin Elmer, Norwalk, USA) mit Alconox und 10%iger (v/v) wässriger Isopropanol-Lösung wurden diese zusammen mit 0,2 mm dicken Abstandhaltern in den Rahmen eingespannt. Die entionisierte Harnstoff-Acrylamidlösung wurde mit TBE-Puffer (Endkonzentration 1x) versetzt und entgast. Die Polymerisation dieser Lösung wurde durch Zugabe von 300 µl 10%iger wässriger APS-Lösung sowie 20 µl TEMED gestartet, die Gellösung zwischen die Glasplatten gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Das polymerisierte Gel wurde in das Sequenziergerät eingebaut und ein Vorlauf bei einer Spannung von 1680 V für eine Stunde in 1x TBE-Puffer durchgeführt. Im Anschluss wurden je 2 µl der Sequenzierproben aufgetragen. Es folgte dann die gelelektrophoretische Auftrennung bei einer Spannung von 1680 V, einer Stromstärke von 50 mA und einer Temperatur von 51°C für 9 h. Mittels eines Argonlasers, der die Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission anregt, erfolgte die Analyse der Rohdaten. Die Lichtimpulse wurden mit einer Kamera aufgenommen und zur Auswertung digitalisiert. Unter Verwendung des ABI PRISMtm 377 Data Collection Programs konnten die Sequenzierdaten errechnet und ausgedruckt werden.

TBE-Puffer

siehe 3.10

Harnstoff-Polyacrylamid-Lösung

Harnstoff	21,00 g
Acrylamid-Lösung (30%)	8,40 ml
TBE-Puffer (10x)	6,00 ml
<i>ad 20 ml aqua bidest</i>	

4.3 Computeranalysen

Die EDV-gestützten Analysen der erhaltenen Nukleotidsequenzen erfolgten mittels Programmteilen des HUSAR (Heidelberg Unix Analysis Resources)-Computerprogrammpakets (Version 4.0) des Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg.

Für die phylogenetische Analyse wurde „maximum likelihood“, ein Modul des PHYLIP-Programm-Paketes (Version 3.57c, J. Felsenstein, University of Washington, Seattle, USA) eingesetzt und mit „Tree view“ (Page, R. D. M., 1996) dargestellt.

5 Ergebnisse

Zum Nachweis des ORF UL142 mittels PCR wurden die Isolate, die von Neugeborenen oder HIV-Patienten gewonnen worden waren, zunächst angezüchtet, um anschließend virale DNA zu gewinnen. Zur näheren Charakterisierung wurde eine *nested* PCR durchgeführt, die erste Hinweise auf eine Hypervariabilität gab. Für die anschließende Sequenzierung wurden die UL142 Amplifikate subkloniert. Die Sequenzen wurden sowohl auf Nukleotid- als auch auf Aminosäureebene verglichen und es wurde der Versuch unternommen, eine Korrelation zu den zugänglichen klinischen Daten herzustellen.

5.1 Nachweis des ORF UL142 in HCMV-Isolaten durch PCR/nested PCR

Zur Amplifikation des ORF UL142 aus viraler DNA wurden zunächst die Virus-Isolate aus 42 Proben (Tab. 8, Spalte 1) angezüchtet (4.1.3) und, wie unter 4.1.4 beschrieben, Virusstocks hergestellt. Aus diesen wurde die DNA mittels QIAamp DNA Mini Kit extrahiert (4.2.1) und die virale DNA als Matrize in der PCR mit UL142 spezifischen Oligonukleotiden („hin“ und „rück“), die am 5'- und am 3'-Ende des ORFs UL142 im *Toledo*-Genom binden, im Überschuss eingesetzt (4.2.2.1). Für die Isolate F72, F73 und S865 wurde zunächst kein Amplifikat in dieser PCR erhalten, so dass Oligonukleotide („ex hin“, „ex rück“) eingesetzt wurden (4.2.2.1), welche außerhalb des ORF UL142 binden (s. Anhang), die folglich zu einem geringfügig größeren Amplifikat führten, welches in der späteren Klonierung eingesetzt werden konnte. Diese Amplifikate sind in Tab. 8 (S. 50-51) nicht aufgeführt. Als Negativ-Kontrolle wurde *aqua bidest*, als Positivkontrolle DNA des wt-Laborstamms *Toledo* als Matrize verwendet.

Zur Überprüfung der PCR wurden je 10 µl der erhaltenen Amplifikatgemische zusammen mit dem Längenstandard VI auf 1,5%ige Agarosegele aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt (4.2.3) und photographisch dokumentiert (Abb. 6).

Für die *nested* PCR (4.2.2.1) wurden Oligonukleotide („in hin“, „in rück“) ausgewählt (3.15.2), welche zu einem verkürzten Amplifikat führten, da die Bindestellen im inneren Bereich des ORF UL142 des *Toledo*-Genoms liegen (s. Anhang). Zur Überprüfung der *nested* PCR wurden je 20 µl der erhaltenen Amplifikatgemische in 1,5%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt (4.2.3) und photographisch dokumentiert (Abb. 7).

Diese Analyse wurde exemplarisch für *Toledo*, *AD 169* und drei klinische Isolate (Dem, Gatt und *UlmCMV*; Tab. 8, Spalte 1) im Doppelansatz durchgeführt. In der ersten PCR wurde erwartungsgemäß bei dem wildtypischen Stamm *Toledo* und den klinischen Isolaten ein Amplifikat in zu erwartender Größe von ca. 920 bp nachgewiesen. Der attenuierte Laborstamm *AD 169* und die Negativkontrolle (*aqua bidest*) waren erwartungsgemäß negativ (Tab. 5, Spalte 1).

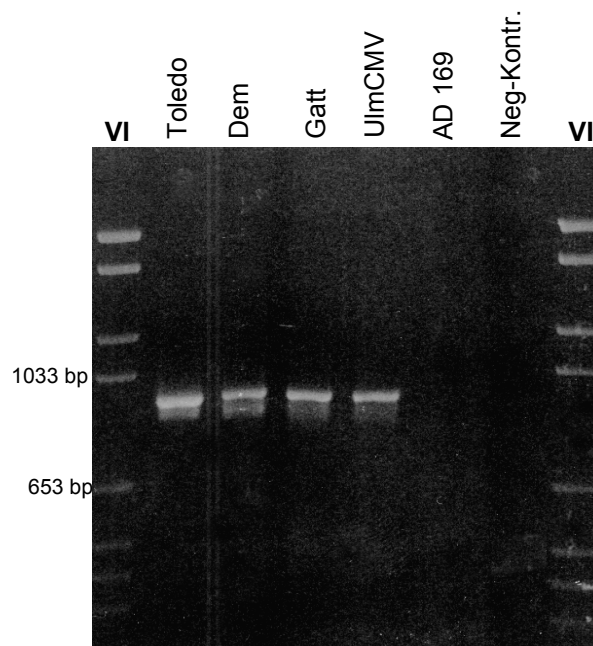


Abb. 6: **Elektrophoretische Auftrennung der durch Standard-PCR amplifizierten UL142 DNA-Fragmente** im 1,5%igen Agarosegel. Dargestellt sind die UL142 PCR-Amplifikate aus *Toledo*, Dem, Gatt und *UlmCMV*. *AD169* und die Negativkontrolle lieferten erwartungsgemäß kein Amplifikat.

In der *nested* PCR (Abb. 7) zeigte sich bei einem klinischen Isolat (Dem) ein von *Toledo* abweichendes Bandenbild, in dem das kleinste zu erwartende Amplifikat der inneren Oligonukleotide nicht gebildet wurde, was einen ersten Hinweis auf Unterschiede in der Sequenz ergab.

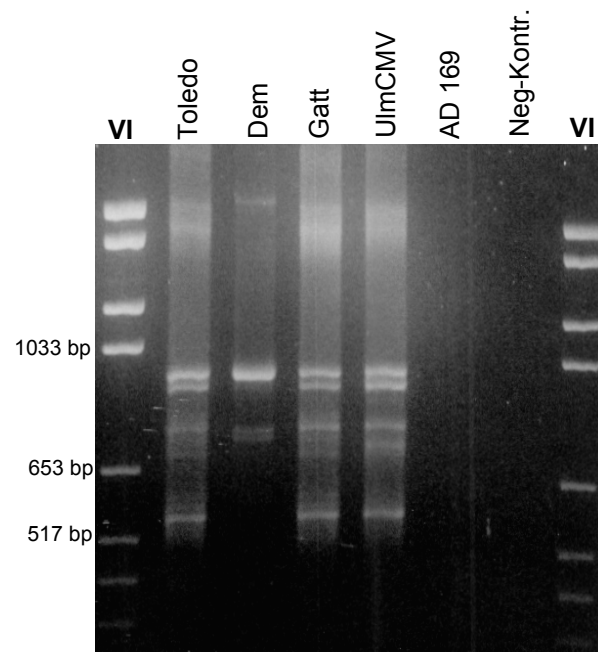


Abb. 7: **Elektrophoretische Auftrennung der mittels *nested* PCR erhaltenen UL142-DNA-Fragmente** im 1,5%igen Agarosegel. Dargestellt sind die UL142 *nested* PCR-Amplifikate aus *Toledo*, Dem, Gatt und UlmCMV. AD169 und die Negativkontrolle lieferten erwartungsgemäß kein Amplifikat.

Im Folgenden wurden 13 Isolate von Patienten mit einer HIV-Grunderkrankung aus Frankfurt und 26 Isolate von Neugeborenen aus Stuttgart in PCR und *nested* PCR auf Abweichungen im Bandenmuster von Stamm *Toledo* untersucht. Es zeigte sich, dass 14 Isolate sich von Stamm *Toledo* unterschieden (s. Tab. 8, Spalte 2). Exemplarisch sind nachfolgend die Agarosegele der Proben aus Frankfurt abgebildet (Abb. 8 u. 9). Die Gele der Gruppe der Neugeborenen aus Stuttgart zeigten vergleichbare Ergebnisse (s. Tab. 8, Spalte 2).

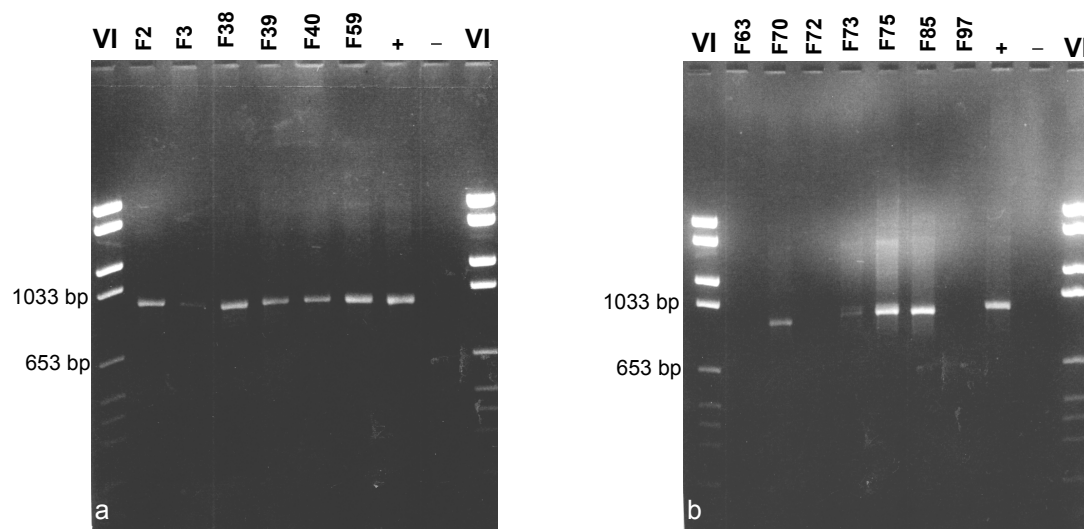


Abb. 8 a+b: **Elektrophoretische Auftrennung der mittels Standard-PCR erhaltenen UL142-spezifischen Amplifikate von Isolaten HIV-positiver Patienten** (Tab. 8, Spalte 1) im 1,5%igen Agarosegel. DNA des Stammes *Toledo* wurde als Positivkontrolle, *aqua bidest* als Negativkontrolle verwendet.

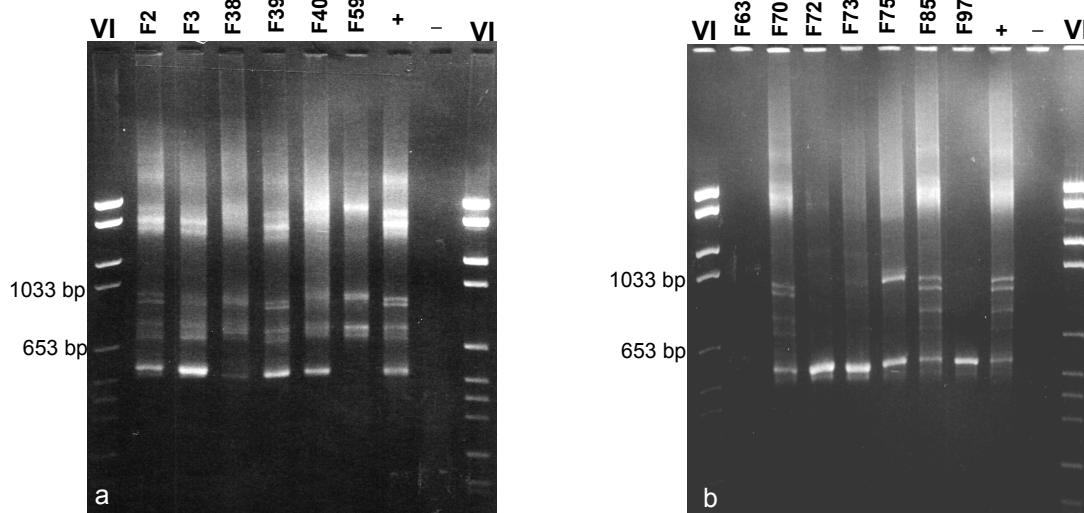


Abb. 9a+b: **Elektrophoretische Auftrennung der mittels nested PCR erhaltenen UL142-spezifischen Amplifikate** der unter Abb. 8 genannten Frankfurter Isolate (Tab. 5, Spalte 1) im 1,5%igen Agarosegel. DNA des Stammes *Toledo* wurde als Positivkontrolle, *aqua bidest* als Negativkontrolle verwendet.

Der wt-Laborstamm *Toledo*, zwei Neugeborenen-Isolate aus Marburg (Dem und Gatt) und weitere 16 Isolate aus Frankfurt oder Stuttgart, davon 9 mit Abweichungen von Stamm *Toledo* in der *nested* PCR, wurden für die Sequenzierung ausgewählt (s. Tab. 8).

	Abweichung in <i>nested</i> PCR von Toledo	Sequenzierung
<u>Frankfurt</u> (Isolate von HIV-Patienten)		
F2	nein	
F3	nein	
F38	nein	+
F39	nein	
F40	nein	+
F59	ja	+
F63	ja/ UL142 nicht nachweisbar	
F70	nein	
F72	ja	+
F73	ja	+
F75	ja	+
F85	nein	
F97	ja	nicht möglich
<u>Stuttgart</u> (Isolate von Neugeborenen)		
S279 (A)	nein	+
S666 (B)	ja	+
S889 (C)	nein	+
S136 (D)	nein	+
S691 (E)	nein	+
S868 (F)	nein	+
S048 (G)	ja	+
S213 (H)	ja	+
S896 (K)	ja	+
S865 (L)	ja	+
S695 (M)	ja	+
S049	ja	
S054	nein	
S066	nein	
S332	nein	

	Abweichung in der PCR/ <i>nested</i> PCR von Toledo	Sequenzierung
S333	nein	
S342	nein	
S478	nein	
S480	nein	
S527	nein	
S567	nein	
S627	nein	
S629	nein	
S777	nein	
S891	nein	
S922	nein	
Marburg (Isolate von Neugeborenen)		
Dem	ja	+
Gatt	nein	+

Tab. 8: **Amplifikation des ORF UL142 von HCMV-Isolaten mittels PCR/ *nested* PCR**
 Spalte 1: Auflistung aller HCMV-Isolate, in Klammern () die abgekürzte Isolatkennung;
 Spalte 2: Abweichung von Stamm *Toledo* in der UL142-spezifischen PCR/ *nested* PCR;
 Spalte 3: Zur Sequenzierung ausgewählte Isolate.

5.2 Subklonierung der UL142-Amplifikate in den Vektor pGEM[®]-T

Die erhaltenen UL142-spezifischen Amplifikate der ersten PCR wurden in den Vektor pGEM[®]-T kloniert, um eine ausreichende Menge an DNA für die Sequenzierung zu gewährleisten, die DNA stabil lagern zu können und eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen.

5.2.1 Ligation, Transformation und Überprüfung der Konstrukte

Zunächst wurden die mittels PCR erhaltenen Amplifikate (s. 5.1) wie unter 4.2.4 beschrieben aufgereinigt und in einer Ligationsreaktion mit dem Vektor pGEM[®]-T eingesetzt (4.2.5). Je 7 µl des gereinigten PCR-Amplifikats wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 50 ng des linearisierten Vektors pGEM[®]-T (Abb. 10) über Nacht bei 4°C ligiert. Die Ligationsansätze wurden für die Trans-

formation (4.2.6.2) von JM 109- bzw. XL1Blue-*E.coli*-Zellen verwendet. Es erfolgte die Transformation (4.2.6.2) in kompetente Zellen (4.2.6.1) und die Anzuchtung auf LB-Agar^{amp/IPTG/X-Gal}-Platten (s. 3.9) über Nacht. Eine erste Selektion plasmidtragender Klone erfolgte über ein *Blau-Weiß-Screening* (4.2.6.2).

Pro Ansatz wurden zur Anzucht einer Bakterienkultur über Nacht acht ampicillinresistente Klone selektioniert und vermehrt. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA im kleinen Maßstab mittels „QIAprep Spin Kit“ isoliert (4.2.7.1) und mittels Restriktion (s. 4.2.9) auf Insertion des UL142-Fragmentes überprüft.

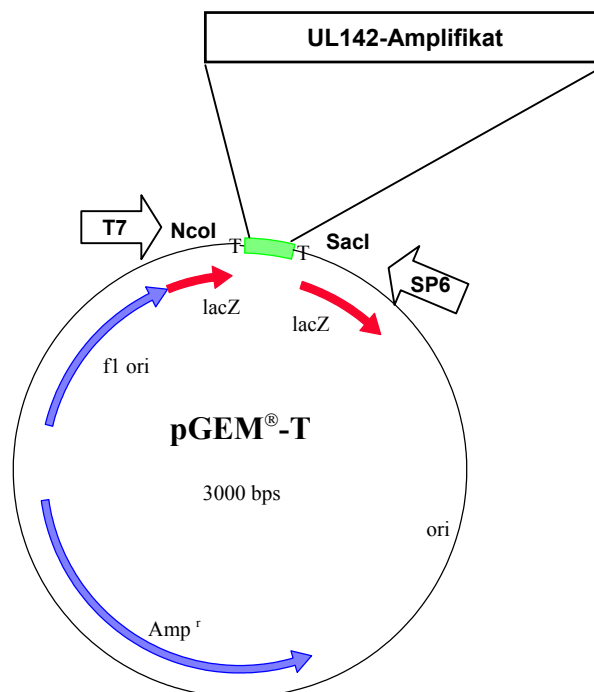


Abb. 10 : **Schematische Darstellung des Konstrukts pGEM®-T UL142**

Dargestellt ist der Expressionsvektor pGEM®-T mit Insertion des UL142-spezifischen PCR-Amplifikats. Die Schnittstellen NcoI und SacI, die für die Restriktion verwendet wurden, sind eingezeichnet.

Nach Inkubation (4.2.9) mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und SacI, die in der Polylinkerregion schneiden, und elektrophoretischer Auftrennung in einem 1%igen Agarosegel wiesen die Klone, die das erwünschte Fragment enthielten, zwei Banden von der Größe des Fragmentes (ca. 920 bp) und des Vektors (3000 bp) auf (Abb. 11).

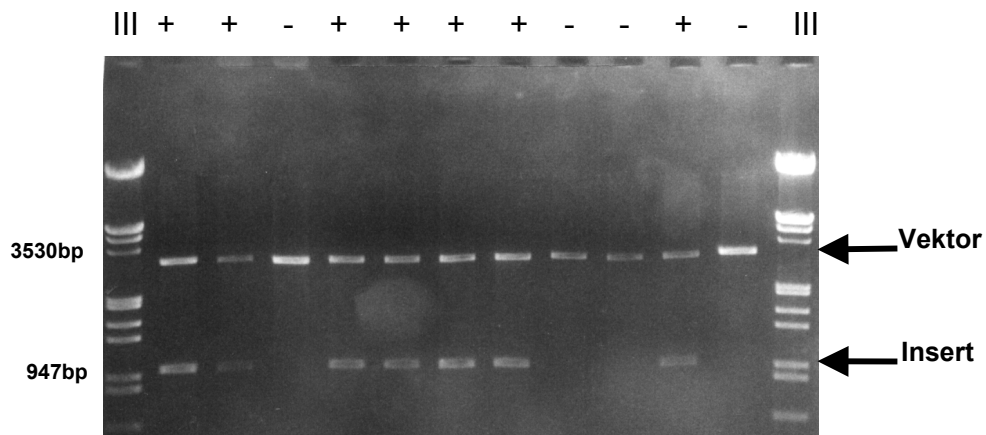


Abb. 11: **Elektrophoretische Auftrennung der durch Restriktion des Konstruktes pGEM®-T-UL142 mit NcoI und SacI erhaltenen Fragmente** im 1%igen TAE/Agarosegel. Klone, die ein inseriertes Fragment enthielten, sind mit „+“, solche ohne Insert mit „-“ gekennzeichnet.

Nach Überprüfung durch Restriktion (4.2.9) wurden für jedes Patientenisolat und Stamm *Toledo* zwei positive Klone ausgewählt, die über Nacht in 300 ml LB-Medium^{amp} (s. 3.9) angezüchtet wurden. Die DNA-Isolierung erfolgte mittels „Qiagen Filter Plasmid Maxi Kit“ (4.2.7.2). Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (4.2.8).

5.3 Analyse der UL142-spezifischen PCR-Amplifikate der ausgewählten HCMV-Isolate mittels Sequenzierung und Computeranalysen

Die Sequenzierungsreaktion, sowie die anschließende Sequenzierung mittels des Elektrophoresesystems (ABI PRISMtm 377 DNA Sequencer, Perkin Elmer, Norwalk, USA) erfolgte wie in 4.2.10 beschrieben.

Von jedem Isolat wurden die Inserts zweier Klone (A und B) sequenziert, um Mutationen, die während der Klonierung entstanden sein können, auszuschließen. Insgesamt wurde der ORF UL142 in jedem Abschnitt dreimal durchsequenziert, um die ermittelte Sequenz bei aufgetretenen Amplifikationsbedingten-Punktmutationen zusätzlich zu verifizieren. Da ein sequenzierter Abschnitt maximal in einer Länge von 500 bp lesbar war, UL142 jedoch eine zu erwartende Größe von ca. 920 bp aufweist, musste der zu sequenzierende Be-

reich in drei Abschnitte, zwei äußere und einen inneren, gegliedert werden. Für die Sequenzierreaktion wurden die unter 3.15.1 angegebenen Oligonukleotide verwendet.

Die einzelnen Sequenz-Fragmente des ORF UL142 des jeweiligen analysierten Isolates wurden mittels „GelMerge“, „GelAssemble“ und „Pretty“ (Module des „DNA Fragment Assembly“-Programms, HUSAR, s. 4.3) zu einem „*consensus*“ zusammengefügt, welcher außerdem mit der *Toledo*-Sequenz verglichen wurde. Die Abbildung 12 zeigt exemplarisch einen Teilbereich der Analyse des Isolates S691 von Nukleotid 1- 146.

Die Abweichungen von der publizierten Sequenz UL142-*Toledo* (Cha et al., 1996; in Kleinbuchstaben) sind im „*consensus*“ durch fettgedruckte Klein-, Übereinstimmungen durch Großbuchstaben dargestellt.

```

From: 1   To: 146

UL142      >                                     atgcggattgaatgggtgtggtggtt 26
EAT1       >                                     CGCGGGATTATGCGGATTGAATGGGTGTGGTGGTT 35
EBT2      >    CGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCCGCGGGATTATGCGGATTGAATGGGTGTGGTGGTT 58
EBT1      >    GTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCCGCGGGATTATGCGGATTGAATGGGTGTGGTGGTT 60
CONSENSUS >    GTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCCGCGGGATTATGCGGATTGAATGGGTGTGGTGGTT 60
          .....+.....+.....+.....+.....+.....+

UL142      >    attcggatactttgtgtcatccgttgggagcgaacggtcattatcctatcgttaccactt 86
EAT1       >    ATTCGGATACTTTGTGTCATCCGTTGGGAGCGAACGGTCATTATCCTATCGTTACCACCT 95
EBT2      >    ATTCGGATACTTTGTGTCATCCGTTGGGAGCGAACGGTCATTATCCTATCGTTACCACCT 118
EBT1      >    ATTCGGATACTTTGTGTCATCCGTTGGGAGCGAACGGTCATTATCCTATCGTTACCACCT 120
CONSENSUS >    ATTCGGATACTTTGTGTCATCCGTTGGGAGCGAACGGTCATTATCCTATCGTTACCACcT 120
          .....+.....+.....+.....+.....+.....+

UL142      >    ggaatctaattcatctaccaacgtggtttgcaacggaacatttccgtgtttgtaaacgg 146
EAT1       >    GGAATCTAATTCATCTGCCAACGTGGTTTGTAACGGAAACATTTCCGTGTTTGTAACGG 155
EBT2      >    GGAATCTAATTCATCTGCCAACGTGGTTTGTAACGGAAACATTTCCGTGTTTGTAACGG 178
EBT1      >    GGAATCTAATTCATCTGCCAACGTGGTTTGTAACGGAAACATTTCCGTGTTTGTAACGG 180
CONSENSUS >    GGAATCTAATTCATCTgCCAACGTGGTTTgtAACGGAAACATTTCCGTGTTTGTAACGG 180
          .....+.....+.....+.....+.....+.....+

```

Abb. 12: Exemplarische Darstellung der Analyse mittels „Gelassemble“ eines Teilbereichs (Nukleotid 1-146) der UL142-spezifischen Sequenz des Isolats S691.

Bei den auf der linken Seite aufgeführten Bezeichnungen der dargestellten Sequenz-Bereiche steht **E**- für Isolat-Kennung (s. Tab. 8, Spalte 1), **A/B**- für den sequenzierten Klon, **T**- für das verwendete T7-Oligonukleotid (s. 3.15.1), **UL142** bezeichnet die publizierte *Toledo*-Sequenz, **consensus** die ermittelte UL142-Sequenz des Isolates.

Nachfolgend sind die prozentualen Übereinstimmungen der UL142-Isolate mit Stamm *Toledo* auf Nukleotidebene aufgelistet (Tab. 9), die zwischen 88,7 % und 96,5 % lagen. Diese Werte wurden mittels „gap“ (HUSAR s. 4.3) erstellt. Die hier bestimmte Sequenz des ORF UL142 des Stamms *Toledo* stimmte vollständig mit der publizierten Sequenz (Cha et al., 1996) überein.

Isolat	%-Übereinstimmung mit Stamm <i>Toledo</i>
<u>Frankfurt-Isolate</u>	
F38	96,940 %
F40	88,817 %
F59	88,708 %
F72	95,765 %
F73	92,157 %
F75	92,266 %
<u>Stuttgart-Isolate</u>	
S279	96,526 %
S666	88,817 %
S889	95,969 %
S136	95,861 %
S691	95,874 %
S868	96,514 %
S048	88,817 %
S213	88,708 %
S896	96,950 %
S865	95,765 %
S695	92,266 %
<u>Marburg-Isolate</u>	
Dem	88,817 %
Gatt	95,657 %

Tab. 9: Prozentuale Übereinstimmung der UL142-spezifischen Nukleotidsequenzen der HCMV-Isolate mit Stamm *Toledo*.

5.4 Phylogenetische Analyse der Mutationen im UL142-Gen des HCMV

Um auf der Basis der nachgewiesenen Mutationen im UL142-Gen Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten HCMV-Isolate in Form eines Dendrogramms darstellen zu können, wurde eine EDV-gestützte Analyse auf Nukleotidebene durchgeführt. Die Isolate wurden gleichwertig analysiert, ohne dass eine „outgroup“ mit Stamm *Toledo* erstellt wurde.

Diese phylogenetische Analyse erfolgte mit „maximum likelihood“ (DNAML, Modul des PHYLIP-Programm-Paketes, s. 4.3). Hierfür wurde zunächst ein Alignment auf Nukleotidebene durchgeführt („Clustal“, HUSAR, s. 4.3) und mit „ToPhylip“ (HUSAR, s. 4.3) in ein „PHYLIP“-gängiges Format überführt. Die Darstellung des Dendrogramms erfolgte mittels „Tree View“ (s. 4.3).

Hieraus ergab sich eine Einteilung der klinischen Isolate in drei Hauptgruppen (Abb. 13), wobei die Hauptgruppe (Gruppe 1) durch die Stämme gebildet wird, welche die deutlichste Verwandtschaft mit Stamm *Toledo* aufweisen. Gruppe 2 steht der Gruppe 1 genetisch näher als Gruppe 3 und besteht nur aus einem Neugeborenen- und 2 Isolaten von HIV-Infizierten. Bei Gruppe 3 lassen sich phylogenetisch zwei Untergruppen unterscheiden.

Beide Patientengruppen verteilen sich im Dendrogramm, so dass eine einheitliche Zuordnung von Neugeborenen- und Isolaten von HIV-Patienten nicht möglich erscheint.

Ebenso verteilen sich die therapierten und nicht therapierten Patienten, wobei für eine definitive Aussage genauere Patientendaten erforderlich sind (s. Tab. 4).

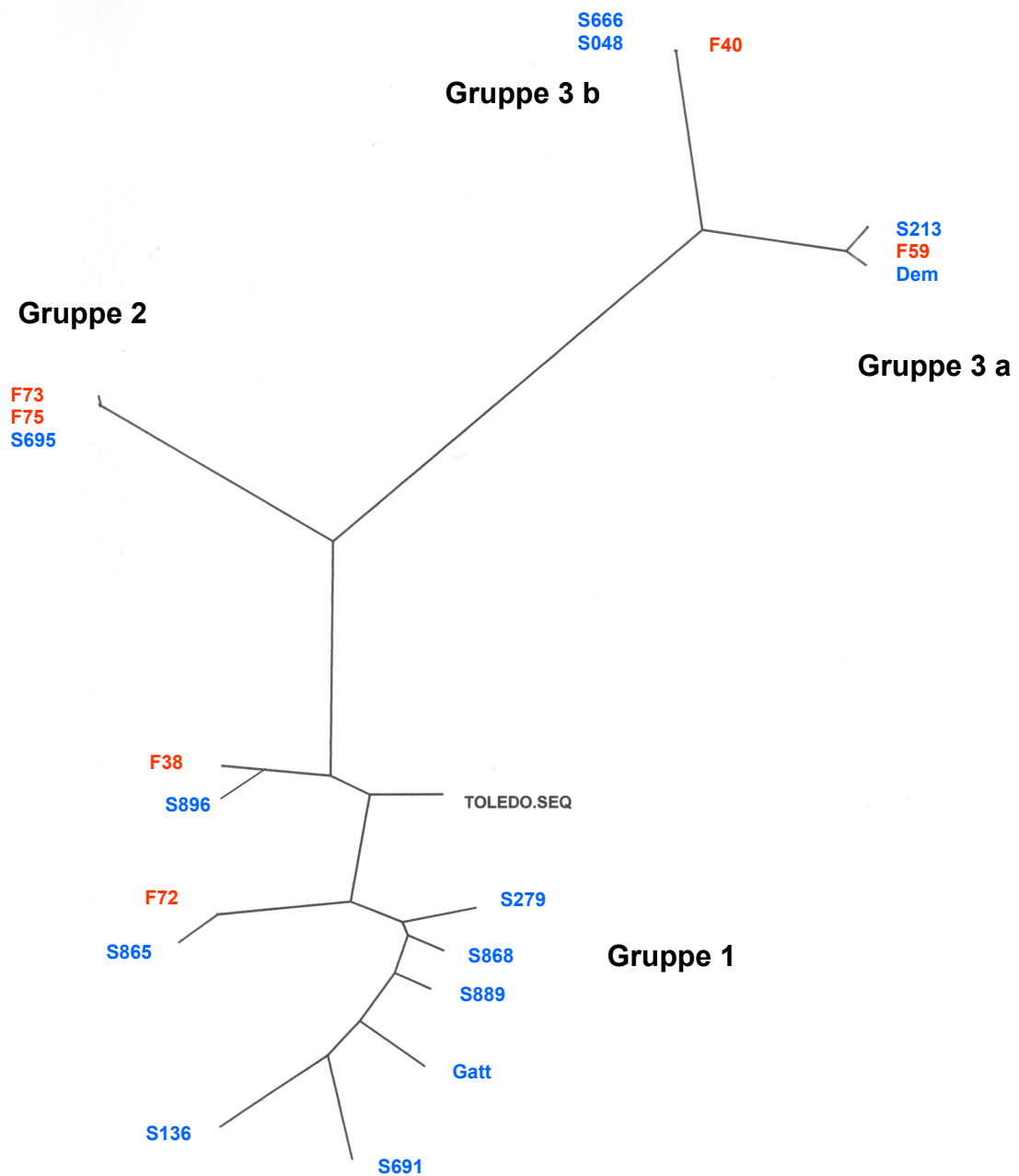


Abb. 13: **Phylogenetische Analyse der UL142-Sequenzen**

Die Analyse erfolgte mit „DNAML“ (PHYLIP, s. 4.3) und ist mittels „Tree View“ (s. 4.3) dargestellt. Die Isolate von HIV-Patienten sind rot, die Neugeborenen-Isolate blau dargestellt.

5.5 Vergleich der UL142-spezifischen Sequenzen der HCMV-Isolate auf Aminosäureebene

Es wurde ein *Alignment* der deduzierten UL142-spezifischen Aminosäuresequenzen der untersuchten HCMV-Isolate durchgeführt, um festzustellen, ob die nachgewiesenen Mutationen zu Aminosäuresubstitutionen führten. Sogenannte „stille Mutationen“ bleiben dabei zunächst unberücksichtigt. Als Referenz diente die UL142-Sequenz von Stamm *Toledo*, welche mit der publizierten Sequenz (Cha et al., 1996) übereinstimmte.

Die Sequenzen der analysierten Isolate wurden mittels „Translate“ (Modul des „Translate DNA into Protein“- Programms, HUSAR, s. 4.3) von der Nukleotidebene auf die Aminosäureebene übersetzt und mittels des Programms „PileUp“ (Modul des „MultipleSequenceAlignment“-Programms, HUSAR, s. 4.3) verglichen und mit dem Programm „Pretty“ (Modul des „MultipleSequenceAlignment“-Programms, HUSAR, s. 4.3) dargestellt (s. Abb. 14).

	1				50
F40	R.Y..A.....L.....
S666	R.Y..A.....L.....
S048	R.Y..A.....L.....
F59				
S213				
Dem				
F73	M.....H....AD....
F75	M.....H....AD....
S695	M.....H....AD....
F38H....AD....
S896CL..		AD....
TOLEDO	MRIEWVWWLF	GYFVSSVGSE	RSLSYRYHLE	SNSSTNVVCN	GNISVFNVT
F72ACL..		AD....
S865ACL..		AD....
GATTCL..R.		
S136C...		A.....
S279C...		A.....
S868N.	A.....
S889C...		A.....
S691A.....
	<u>pot. Signalpeptid</u>				

	51				100
F40DV.I.	--IG.PYP.VIN...	..K..IS.TT	...Y..NT..
S666DV.I.	--IG.PYP.VIN...	..K..IS.TT	...Y..NT..
S048DV.I.	--IG.PYP.VIN...	..K..IS.TT	...Y..NT..
F59DV.I.	--IG.PYP.VIS...	..K..IL.TT	...Y..NT..
S213DV.I.	--IG.PYP.VIS...	..K..IL.TT	...Y..NT..
DemDV.I.	--IG.PYP.VIS...	..K..L.TT	...Y..NT..
F73	.C....V.I.	TLPA.PFS.V	.Y...GYIQW	..RS.I..TT	.S.HV.TN..
F75	.C....V.I.	TLPA.PFS.V	.Y...GYIQW	..RS.I..TT	.S.HV.TN..
S695	.C....V.I.	TLPA.PFS.V	.Y...GYIQW	..RS.I..TT	.S.HV.TN..
F38	---S.....
S896	.S.....	---I.....
TOLEDO	LGVRYNITVG	---ISSLLI	GHLTIQVLES	WFTPWVQNKs	YNKQPLGDTE
F72	---.....VT...R.....
S865	---.....VT...R.....
GATT	---T...S....ST..
S136	---T...	...S.....	.S....ST..
S279	---...S..I.....
S868	---I.....
S889	---...S..I....ST..
S691	.S.....	---T...	...S.....	.S....ST..

	101				150
F40V.A..L	R.....YKQ	R.V.TS....	...N....I.A....
S666V.A..L	R.....YKQ	R.V.TS....	...N....I.A....
S048V.A..L	R.....YKQ	R.V.TS....	...N....I.A....
F59	.F..V.A..L	R.....YKL	G.V.TS....	...N...NI.	..E.....
S213	.F..V.A..L	R.....YKL	G.V.TS....	...N...NI.	..E.....
Dem	.F..V.A..L	R.....YKL	G.V.TS....	...N...NI.	..K.....
F73	-.....-
F75	-.....-
S695	-.....-
F38I.....	-.....-
S896	-.....-
TOLEDO	TLYNIDSENI	HRVSQYFHTR	-WIKS-LQEN	HTCDLTNSTP	TYTYQVNVNN
F72	-.....-A....
S865	-.....-A....
GATT	-.....-
S136	-.....-A....
S279	-.....-M..
S868N..	-.....-A....
S889	-.....-A....
S691	-.....-I....

	151				200
F40A.H.
S666A.H.
S048A.H.
F59	.D....I...	...H....T.K.
S213	.D....I...	...H....T.K.
Dem	.D....I...	...H....T.K.
F73
F75
S695
F38
S896
TOLEDO	TNYLTLT SSG	WQDRLNVTVI	NSTHFNLTES	NIT S IQKYLN	TTCIERLRNY
F72A.H.
S865A.H.
GATTA.H.
S136A.H.
S279N..R...
S868A. I .H.
S889 FLA.H.
S691I...

	201				250
F40	... PV..PE..	I..LY.T...	A...KD....
S666	... PV..PE..	I..LY.T...	A...KD....
S048	... PV..PE..	I..LY.T...	A...KD....
F59	... PM	...V..P..I	...LY.T...	A....D....
S213	... PM	...V..P..I	...LY.T...	A....D....
Dem	... PM	...V..P.YI	...LY.T...	A....D....
F73V	...L..T. QG	.-...D...R
F75V	...L..T. QG	.-...D...R
S695V	...L..T. QG	.-...D...R
F38V	...L..T. RG	--...D...R
S896V	...L..T. RG	.-...D...R
TOLEDO	TLE S VYTTTV	PQNITTSQHA	TTTMHTIPP N	TITIQT T QS	HTVQTPSFND
F72	... PV..P...	I..LY.T...D....
S865	... PV..P...	I..LY.T...D....
GATT	... PV...E..	I..LY.T...	A...KD....
S136	..K.....	...V..P..T	...LY.-...	A....D....
S279	... PV..PE..	I..LY.T...	A...KD....
S868	... PV.-PE..	I..LY.T...	A...KD....
S889	... PV..PE..	I..LY.T...	A...N-...
S691	... PV..P...	I..LY.T..DD....

	251			300
F40E.....	V.....	
S666E.....	V.....	
S048E.....	V.....	
F59E.....	V.....	S.....
S213E.....	V.....	S.....
DemE.....	V.....	S.....
F73E.....	V.....	S.....
F75E.....	V.....	S.....
S695E.....	V.....	S.....
F38E.....	V.....R.....
S896E.....	V.....R.....
TOLEDO	THNVTKHTLN	ISYVLSQKTN	NTTSPWIYAI	<u>PMGATATIGA</u> <u>GLYIGKHFTP</u>
F72E.....	V.....	
S865E.....	V.....	S.....
GATTE.....	.N.....V.....	S.....
S136E.....	.N.....V.....	S.....
S279E.....	A.....	.I.....
S868E.....	V.....	
S889E.....	V.....	
S691E.....	V.....	
				<u>pot. Membranankerregion</u>

	301	312
F40W..	.*
S666W..	.*
S048W..	.*
F59	.R.....W..	.*
S213	.R.....W..	.*
Dem	.RS....W..	.*
F73	.R.....W..	.*
F75	.R.....W..	.*
S695	.R.....W..	.*
F38	MR.....W..	.*
S896	.R.....W..	.*
TOLEDO	VKFVYEVCRG	Q*
F72W..	.*
S865	.R.....W..	.*
GATT	.R.....W..	.*
S136	.R.....W..	.*
S279W..	.*
S868W..	.*
S889W..	.*
S691W..	.*

Abb. 14: **Alignment der UL142-spezifischen Sequenzen der untersuchten HCMV-Isolate auf Aminosäureebene**

Substitutionen auf Aminosäureebene sind durch die jeweils angegebenen Buchstaben gekennzeichnet. Die Abkürzungen der Aminosäuren sind dem Anhang zu entnehmen (s. 9.2; S. 79). Der Vergleich erfolgte mit der Sequenz des ORF UL142 von Stamm *Toledo* als Referenz, wobei AS-Austausche in veränderter Polarität und Größe fett markiert sind. Punkte stehen für Übereinstimmung, Striche für Deletionen; Pot. Signalpeptid und Membranankerregion sind unterstrichen.

Auffällig bei dieser Analyse waren Insertionen von drei Aminosäuren an Position 61-63 bei den Isolaten F73, F75 und S695, sowie von jeweils einer Aminosäure bei den Isolaten F40, F59, S666, S048, S213 und Dem an den Positionen 63, 121 und 126.

Ebenso fanden sich Deletionen von zwei Aminosäuren bei Isolat F38 an Position 231-232 und von jeweils einer Aminosäure an Position 232 bei den Isolaten F73, F75, S896 und S695, an Position 216 bei Isolat S868, an Position 227 bei Isolat S136 und an Position 236 bei Isolat S889.

Ein Austausch von Aminosäuren war in verschiedenen Bereichen zu beobachten, wobei sich jedoch zwei Regionen hervorhoben, in denen diese gehäuft vorlagen. Diese sogenannten „Hot Spots“ liegen im Bereich von Position 56 bis 136 (N-terminal) und im Bereich von Position 204 bis 231 (C-terminal).

Außerdem fanden sich mehrere Positionen, wo sich durch den Austausch der Aminosäure nicht nur die Polarität, sondern auch die Größe der Aminosäure veränderte. Die entsprechenden Aminosäuren sind in der Abbildung 14 fett markiert.

An den Positionen 14, 210 und 301 findet sich bei einigen Isolaten eine Substitution durch ein Methionin, welches ein Startcodon darstellt.

6 Diskussion

Die Infektion mit dem humanen Cytomegalievirus (HCMV) führt in vivo nachweislich zur Schädigung unterschiedlicher Organe und Zelltypen. Vielfach passagierte attenuierte Laborstämme, wie z.B. *AD 169*, infizieren demgegenüber fast ausschließlich humane Fibroblasten und haben die Fähigkeit verloren, sich z.B. in Endothelzellen zu replizieren. Darüber hinaus sind derartige Laborstämme nicht mehr humanpathogen (Mac Cormac & Grundy, 1999). Demgegenüber stehen sogenannte *wildtypische* Laborstämme wie Stamm *Toledo*, bei denen ebenso wie bei klinischen Isolaten die Humanpathogenität erhalten ist. Interessanterweise wurde bei diesen wildtypischen Laborstämmen und klinischen Isolaten zusätzliche genetische Information (UL133-UL154) nachgewiesen, die bei den attenuierten apathogenen Laborstämmen nicht vorhanden ist. Es wird deshalb diskutiert, ob dieser zusätzliche Genomabschnitt eine Relevanz für die virale Pathogenität besitzt (Cha et al., 1996).

Bisher wurde das Gen UL144 aus dieser Region untersucht, welches eine Sequenzhypervariabilität aufwies (Lurain et al., 1999). Die Isolate stammten von Transplantatempfängern und HIV-positiven Patienten, bei denen sich allerdings ein augenfälliger Zusammenhang zwischen Klinik- und Sequenzvariabilität nicht herstellen ließ. Neben diesem potentiellen Typ-I-Transmembranprotein, das als HVEM-Strukturhomolog (herpes simplex virus entry mediator) identifiziert wurde, weist Toledo 10 weitere ORFs auf, die für potentielle Glykoproteine kodieren (Lurain et al., 1999), die für die virale Infektiosität und den Zelltropismus eine Bedeutung besitzen könnten. UL142 stellt einen dieser ORFs dar.

Für UL142 konnte bisher nachgewiesen werden, daß es während des viralen Infektionszyklus transkribiert wird und in vitro translatiert wird. Nach transienter Transfektion in Zellkultur ist eine mRNA nachweisbar (H. Schmitz, Diplomarbeit 2000). Weiterhin wurde nachgewiesen, daß es sich bei der UL142-spezifischen mRNA in infizierten Zellen um ein spätes Transkript handelt (T. Schreiber, Diplomarbeit 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass das pUL142-Protein in transfizierten Zellen im Endoplasmatischen Retikulum, aber nicht im Golgi Apparat lokalisiert ist (A. Dittmer, Diplomarbeit 2002).

Die Frage, ob das UL142-Produkt im infizierten Organismus immunogen ist, wird zur Zeit untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein eventueller genetischer Polymorphismus des ORF UL142 bei klinischen HCMV-Isolaten untersucht und ein möglicher Bezug zur Pathogenität der Isolate überprüft werden.

6.1 Auswahl der Isolate

Bereits erste Hinweise auf einen genetischen Polymorphismus des ORF UL142 bei klinischen Isolaten ergab die Standard PCR/*nested* PCR-Analyse weniger klinischer Isolate.

Für die weitere Untersuchung wurden gezielt klinische Isolate aus zwei Patientengruppen, zum einen von Neugeborenen und zum anderen von HIV-positiven Patienten, vor allem deswegen ausgewählt, da das HCMV bei diesen Gruppen unterschiedliche Krankheitsbilder verursacht. Zudem sind diese Patientengruppen einsichtigerweise unterschiedlichen Selektionseinflüssen ausgesetzt, z. B. wurden die HCMV-Isolate z. T. erst nach erfolgter HCMV-spezifischer Behandlung gewonnen.

Wünschenswert wäre gewesen, auch HCMV-Isolate von gesunden Erwachsenen in die Untersuchungen mit einzubeziehen. Allerdings sind diese nur schwer erhältlich, da eine asymptomatische Infektion bei den Betroffenen keinen Anlaß für diagnostische Maßnahmen darstellt.

6.2 Deduzierte Eigenschaften des UL142

Die Sequenz der Isolate wurde von der Nukleotidebene auf die Aminosäureebene übersetzt, um eventuelle Auswirkungen von Punktmutationen beurteilen zu können. Als Referenz wurde zunächst die Sequenz von Stamm Toledo verwendet, wobei dieser Stamm nach der genetischen Analyse der Hauptgruppe zuzuordnen ist. In der Mehrzahl der nachgewiesenen Substitutionen handelte es sich um Austausch durch Aminosäuren vergleichbarer Größe und Polarität. In einigen Bereichen waren allerdings Substitutionen durch Aminosäuren unterschiedlicher Größe und Polarität nachweisbar, was Auswirkungen auf die Faltung des UL142-Produkts haben könnte. Diese 14 Bereiche sind in der Abbildung 14 durch Fettdruck markiert.

Ebenso findet sich bei einigen Isolaten an den Positionen 14, 210 und 301 eine Substitution durch ein Methionin, welches ein Startcodon darstellt.

Insgesamt lässt sich aus der deduzierten Aminosäuresequenz des potentiellen pUL142 eine ausgeprägte Glykosylierung ableiten, auffällig ist vor allem eine starke O-Glykosylierung (Häufung von Serin und Threonin, Hart et al., 1989). Auf Grund dieser Modifikation wäre bei dem zu erwartenden Molekulargewicht zusätzliche ca. 45 kDa zu berücksichtigen. Allerdings weist jede der vorausgesagten N-Glykosylierungsstellen (s. Anhang, S. 81) bei den Konsensus-Sequenzen der Isolate mindestens eine Mutation auf, was somit wiederum eine eventuelle Auswirkung auf das zu erwartende Molekulargewicht haben könnte.

Ungewöhnlich sind die beiden deduzierten Aminosäuren-Sequenzfolgen GSPYP (Position 64-68) und GYIQW (Position 76-80), welche bei einigen klinischen Isolaten vorlagen. Eine Datenbanksuche ergab keine vergleichbaren Gene, bei denen diese Sequenzen wiedergefunden wurden.

An fünf Stellen war bei einigen klinischen Isolaten ein Austausch der Aminosäure Serin bzw. Leucin gegen Prolin nachweisbar, bzw. wurde Prolin eingefügt oder durch Glutamin/Arginin ersetzt. Prolin kann als sogenannter „Helixbrecher“ zu einer Loop-Bildung führen, so dass auch hier ein Hinweis vorlag, dass es auf Grund von Mutationen zu einer Strukturänderung des Isolat-spezifischen pUL142 kommen könnte.

Auf der Basis des Alignments auf Nukleotidebene ließ sich eine Gruppeneinteilung bei den untersuchten HCMV-Isolaten vornehmen. Genetische Hypervaria-

bilitäten wurden bereits für den ORF UL144 (Lurain et al., 1999) und UL55 (Glykoprotein B (gB)) (Chern et al., 1998; Vogelberg et al., 1996) beobachtet, die ebenfalls als Grundlage für Gruppierungen verwendet wurden. Es konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen den Gruppen dieser beiden Proteine hergestellt werden (Lurain et al., 1999). Das Phänomen der Hypervariabilität ist auch für weitere herpesvirale Produkte beschrieben worden (Lee et al., 1997; Triantos et al., 1998). So wird UL144 mit dem hypervariablen Gen K1 des Humanen Herpesvirus 8 verglichen (Lurain et al., 1999), welches ebenfalls für ein Transmembranprotein kodiert. Auch für das K1-Protein können vier große Gruppen unterschieden werden (Lee et al., 1998; Zong et al., 1999).

6.3 Korrelation zum klinischen Phänotyp

Nach der hier durchgeführten phylogenetischen Analyse der untersuchten HCMV-Isolate konnte für den ORF UL142 eine Einteilung in drei Gruppen vorgenommen werden, wobei sich die Gruppe drei in zwei Untergruppen unterteilen läßt.

Um einen Zusammenhang zwischen viralen Genotyp und klinischen Phänotyp herstellen zu können, wurden als Kriterien die Patientengruppe, die zugänglichen klinischen Daten sowie der Zeitpunkt der Virusisolierung in Betracht gezogen. Aufgrund der vorliegenden Informationen waren eindeutige Beziehungen nicht erkennbar. Die drei Patientengruppen sind auf die unterschiedlichen genotypischen Gruppen verteilt. Es ließ sich keine Abgrenzung der symptomatischen von den asymptomatischen Neugeborenen ableiten. Auch der kongenitale oder postnatale Zeitpunkt der Infektion ließ keine Einteilung erkennen. Bei den Isolaten von HIV-Patienten ließ sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen Virusisolierung, Therapie und Symptomatik herstellen.

Ein weiteres Kriterium wäre die geographische Herkunft der Isolate. Die genannten K1-Genotypen des HHV 8 lassen sich z.B. mit dem geographischen und ethnischen Patientenhintergrund korrelieren (Zong et al., 1999).

Ebenso konnten die HCMV gB-Typen, deren Hypervariabilität und Einteilung in vier Hauptgruppen mehrfach belegt ist (Chou, S. and K. M. Dennison, 1991;

Meyer-König et al., 1998; Rasmussen et al., 1997) ebenfalls Patientengruppen aus Italien, Kalifornien und aus dem afrikanischen Raum geographisch zugeordnet werden (Zipeto et al., 1998). Es scheint in der Tat ein genotypischer Unterschied der gB-Gruppen zwischen Kaukasiern und Japanern zu bestehen (Wada et al., 1997).

Da allerdings die hier untersuchten Isolate zum größten Teil aus auswärtigen Laboren in Deutschland stammten, bzw. der Anonymität unterlagen, war eine Zuordnung der geographischen Herkunft nicht möglich.

Eine Zuordnung der Isolate entsprechend ihrer gB-Gruppen-Zugehörigkeit erfolgte hier nicht. Eine gB-Analyse wurde, wie sie bei UL144 ohne relevante Gruppierung erfolgte (Lurain et al., 1999), nicht durchgeführt.

Aufgrund des komplexen HCMV-Genoms ist anzunehmen, dass im Rahmen der Pathogenese membranassoziierten viralen Proteinen bei der Interaktion mit unterschiedlichen Zelltypen eine besondere Bedeutung zukommt. Einigen viralen Produkten, wie US2, UL18 und US28, konnte z. B. eine immunmodulierende Funktion zugeordnet werden (Jones and Sun, 1997; Pleskoff et al., 1997; Reyburn et al., 1997).

Untersuchungen am Hüllmembranprotein gB zeigten zwar, daß die Sequenzhypervariabilität keinen prinzipiellen Einfluß auf die Funktion des Genprodukts *in vitro* hat. Es ist andererseits möglich, daß die genetische Variabilität die Antikörperantwort beeinflusst. Es wird berichtet, daß humane HCMV Antikörper-positive Seren in ihrer neutralisierenden Aktivität gegen verschiedene Patientenisolate variieren (Benedict et al., 1999; Klein et al., 1999). Die divergierenden Titer ließen sich jedoch nicht mit der genotypischen Einteilung in Korrelation bringen (Klein et al., 1999). Ähnliche Untersuchungen gibt es zu UL144 des HCMV, bei denen HCMV Antikörper-positive Seren unterschiedliche Reaktivität auf UL144 exprimierende Zellen aufwiesen (Benedict et al., 1999). Aber auch hier konnte kein Zusammenhang mit den genotypischen Gruppen hergestellt werden (Lurain et al., 1999).

Die Frage nach der möglichen immunmodulierenden Funktion des HCMV pUL142 lässt sich zur Zeit nicht beantworten, da entsprechende Untersuchungen z.B. zur Struktur, zellbiologischen Aspekten und Immunogenität des Genproduktes noch ausstehen.

7 Zusammenfassung

Klinische Isolate und der *wildtypische* Laborstamm *Toledo* des humanen Cytomegalievirus weisen einen Genomabschnitt auf, der in attenuierten, nicht humanpathogenen Laborstämmen fehlt. Zu diesen zusätzlichen Genen gehört auch ORF UL142, der als potentiell Glykoprotein eine mögliche Rolle bei der viralen Pathogenese spielen könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden 42 Proben aus zwei Patientengruppen (Neugeborene und HIV-Positive) mittels UL142-spezifischer PCR untersucht. Hiervon wurden 19 Isolate ausgewählt und für die folgende Sequenzierung kloniert. Die ermittelten Sequenzen wurden zum einen auf Aminosäureebene verglichen, wobei zwei hypervariable Bereiche (Position 56-136: N-terminal und Position 204-231: C-terminal), sowie Deletionen und Insertionen identifiziert wurden. Zum anderen wurden die Isolate auf Nukleotidebene phylogenetisch analysiert.

Diese EDV-gestützte genotypische Analyse der Isolate ergab drei Hauptgruppen, wobei sich eine Gruppe in zwei Untergruppen aufgliedert. Eine offensichtliche, mögliche Korrelation zwischen klinischem Phänotyp und dem genetischen Polymorphismus des UL142 ließ sich nicht feststellen.

8 Literatur

Benedict, C. A., Butrovich, Lurain, Corbeil, Rooney, Schneider, Tschopp, Ware (1999)

A Novel Viral TNF Receptor Superfamily Member in Virulent Strains of Human Cytomegalovirus

The Journal of Immunology **162**: 6967-6970

Bogner, E., Radsak K, Stinski MF (1998)

The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity.

J Virol **72**(3):2259-64.

Britt WJ (1996)

Vaccines against human cytomegalovirus: time to test

Trends in Microbiology **4**(1): 34-38

Britt., W.J. and Alford, C.A. (1996)

Cytomegalovirus. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. et al. (eds.): Virology.

Vol.2, 3rd Edition, Raven Press, N.Y., Chapter 70.

Bullock, W. O., Fernandez, J.-M. -. & Short, J. M. (1987)

XL1-blue: A high efficiency plasmid

transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection.

BioTechniques **5**, 376-378.

Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, Spaete RR (1996)

Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains

J Virol **70** (1): 78-83

Chandler SH, McDougal JK (1986)

Comparison of restriction site polymorphisms among clinical isolates and laboratory strains of human cytomegalovirus.

J Gen Virol **67** (Pt 10):2179-92

Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM,

Moore PS (1994)

Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma

Science **16**;266(5192):1865-9.

Chee, M., S.A. Rudolph, B. Plachter, B. Barrell, and G. Jahn (1989)

Identification of the major capsid protein gene of human cytomegalovirus.

J Virol. **63**:1345-53.

- Chee, M.S., A.T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C.M. Brown, R. Cerny, T. Hornsnell, I. Hutchinson, T. Kouzarides, J. Martignetti, E. Preddie, S. Satchwell, P. Tomlison, K. Weston, and B. Barrell** (1990)
Analysis of the protein-coding content of the sequence of Human Cytomegalovirus strain AD169.
Curr Top Microbiol Immunol. 154:125-169.
- Chern KC, Chandler DB, Martin DF, Kuppermann BD, Wolitz RA and Margolis TP** (1998)
Glycoprotein B subtyping of cytomegalovirus (CMV) in the vitreous of patients with AIDS and CMV retinitis
J Infect. Dis. **178** :1149-1153
- Chou, S. and K. M. Dennison** (1991)
Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes
J Infect Dis.; **163**(6):1229-34.
- Compton, T., R.R. Nepomuceno, and D.M. Nowlin** (1992)
Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface.
Virology. 191:387-95.
- Compton, T., D.M. Nowlin, and N.R. Cooper** (1993)
Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate.
Virology. 193:834-41.
- De Jong, M. D., Galasso, G. J., Gazzard, B., Griffiths, P. D., Jabs, D., Kern, E., Spector, S.** (1998)
Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus
Antiviral Research 39: 141-162
- Doerr HW.** (1987)
Cytomegalovirus infection in pregnancy.
J Virol Methods **17**(1-2):127-32
- Dumas, A.M.; Geelen, J.L.M.C.; Maris, W. and Van der Noorda, J.** (1980)
Infectivity and molecular weight of varizella- zoster virus DNA.
J. Gen. Virol. **47**, 233-235.
- Elek, S.D., and H. Stern** (1984)
Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero.
Lancet:i:1-5.
- Epstein, M.A., G. Henle, B.G. Achong, and Y.M. Barr** (1965)
Morphological and biological studies on a virus in cultured Lymphoblasts from Burkitt's lymphoma.
J Exp Med. **121**:761-70.

- Fisher, S., Genbacev, O., Maidji, E., Pereira, L.** (2000)
Human Cytomegalovirus Infection of Placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: Implications for transmission and pathogenesis
Journal of Virology **74**: 6808-20
- Frenkel, N., E.C. Schirmer, L.S. Wyatt, G. Katsafanas, E. Roffman, R.M. Danovich, and C.H. June** (1990)
Isolation of a new herpesvirus from human CD4+T cells.
Proc Natl Acad Sci. **87**:748-52.
- Geballe, A.P., F.S. Leach, and E.S. Mocarski.** (1986)
Regulation of cytomegalovirus late gene expression: gamma genes are controlled by posttranscriptional events.
J Virol. **57**:864-74.
- Gibson W, Irmieri A.** (1984)
Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world.
Birth Defects Orig Artic Ser.; **20**(1):305-24. Review
- Grattan MT, Moreno-Cabral CE, Starnes VA, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE.** (1989)
Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis.
JAMA **261**(24):3561-6
- Griffiths, P. D,** (2002)
The treatment of cytomegalovirus infection
Journal of Antimicrobial Chemotherapy **49**,243-253
- Gruter, W.** (1924)
Das Herpesvirus, seine aetiologische und klinische Bedeutung.
Muench. Med. Wochenschr. **71**, 1058-1060.
- Gupta, P., S. ST Geor, F. Rapp** (1977)
Comparison of polypeptides of several strains of Human Cytomegalovirus.
J Gen Virol. **34**: 447-54
- Hart, GW, Haltiwanger RS, Holt GD, Kelly, WG** (1989)
Glycosylation in the nucleus and cytoplasm
Annu Rev Biochem. **58**: 841-74
- Hayward, G.S., R. Ambinder, D. Ciufo, S.D. Hayward, and R.L. LaFemina.** (1984)
Structural organization of human herpesvirus DNA molecules.
J Invest Dermatol. **83**:29s-41s.

- Hemmings, D.G., Kitani, R., Nykiforuk, C., Preiksaitis, J., Guilbert, L.J.** (1998)
Permissive cytomegalovirus infection of primary villous term and first trimester trophoblasts
Journal of Virology **72**:4970-9
- Hinkle AM, Lee JA, Bell KA, & Hsu S** (2000)
A review of antiviral therapies in the treatment of cytomegalovirus
Dermatologic Therapy **13**:269-276
- Huang, E.S., B.A. Kilpatrick, Y.T. Huang, and J.S. Pagano** (1976)
Detection of human cytomegalovirus and analysis of strain variation.
Yale J Biol Med. **49**:29-43.
- Jones TR, Sun L.** (1997)
Human cytomegalovirus US2 destabilizes major histocompatibility complex class I heavy chains.
J Virol.; **71**(4):2970-9
- Klein M, Schoppel K, Amvrossiadis N, Mach M.** (1999)
Strain-specific neutralization of human cytomegalovirus isolates by human sera.
J Virol.; **73**(2):878-86.
- Krech U.** (1973)
Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world.
Bull World Health Organ.; **49**(1):103-6.
- Kumar ML, Nankervis GA.** (1979)
Cytomegalovirus infections
South Med J ; **72**(7):854-61
- Landini, M.P., and R.R. Spaete** (1993)
Human Cytomegalovirus structural proteins: A report of the first nomenclature workshop in: Michelson, S. and Plotkin, S.A. (eds.): Multidisciplinary approach to understanding Cytomegalovirus disease, Elsevier, Amsterdam. 65-74.
- Lee H, Trimble JJ, Yoon DW, Regier D, Desrosiers RC, Jung JU.** (1997)
Genetic variation of herpesvirus saimiri subgroup A transforming protein and its association with cellular src.
J Virol.; **71**(5):3817-25.
- Lee H, Guo J, Li M, Choi JK, DeMaria M, Rosenzweig M, Jung JU** (1998)
Identification of an immunoreceptor tyrosine-based activation motif of K1 transforming protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Mol Cell Biol.*; **18**(9):5219-28.

Lindquester, G.J. and Pellett, P.E. (1991)

Properties of the human herpesvirus 6 strain Z29 genome: G+C content, length, and the presence of variable- length repeated terminal sequence elements.

Viol. **182**, 102-110.

Lurain NS, Kapell KS, Huang DD, Short JA, Paintsil J, Winkfield E, Benedict CA, Ware CF, Bremer JW. (1999)

Human cytomegalovirus UL144 open reading frame :sequence hypervariability in low-passages clinical isolates

J Virol **73** (12): 10040-50

MacCormac LP, Grundy JE (1999)

Two clinical isolates and the Toledo strain of cytomegalovirus contain endothelial cell tropic variants that are not present in the AD169, Towne, or Davis strains

J Med Virol **57**(3):298-307

Macher AM, Reichert CM, Straus SE, Longo DL, Parrillo J, Lane HC, Fauci AS, Rook AH, Manischewitz JF, Quinnan GV Jr. (1983)

Death in the AIDS patient: role of cytomegalovirus.

N Engl J Med; **309**(23):14

Mascolini M. (1996)

CMV resistance: "more complicated than we thought".

J Int Assoc Physicians AIDS Care ;**2**(5):37-9.

Matthews T, Boehme R.(1988)

Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir

Rev Infect Dis.;**10** Suppl 3:S490-4. Review

McVoy MA, Adler SP. (1994)

Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer.

J Virol.;**68**(2):1040-51

Meyer-König U., Vogelberg C., Bongarts A., Kampa D., Delbrück R., Wolff-Vorbeck G., Kirste G., Haberland M., Hufert F., von Laer D. (1998)

Glycoprotein B genotype correlates with cell tropism in vivo of human cytomegalovirus infection

Journal of Medical Virology **55**:1, 75-81

Meyers, J.D. (1989)

Prevention of cytomegalovirus infection after marrow transplantation.

Rev Infect Dis ;**11** Suppl 7:S1691-705

Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U & Helenius A. (2000)

Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro

Moll Cell Biol **20**: 4922-31

- Oram RJ, Herold BC.** (1998)
Antiviral agents for herpes viruses.
Pediatr Infect Dis J; **17**(7):652-3.
- Oram JD, Downing RG, Akrigg A, Dollery AA, Duggleby CJ, Wilkinson GW, Greenaway PJ.** (1982)
Use of recombinant plasmids to investigate the structure of the human cytomegalovirus genome.
J Gen Virol; **59**(Pt 1):111-29.
- Page, R. D. M.** (1996)
TreeView : an application to display phylogenetic trees on personal computers.
Comput. Appl. Biosci. **12**: 357-358
- Pass, R.** (2000)
Cytomegalovirus. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. et al. (eds.): Virology. Vol.2, 4th Edition, Raven Press, N.Y.,
- Penfold ME, Dairaghi DJ, Duke GM, Saederup N, Mocarski ES, Kemble GW, Schall TJ.** (1999)
Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine.
Proc Natl Acad Sci U S A.; **96**(17):9839-44.
- Pleskoff O, Treboute C, BreLOT A, Heveker N, Seman M, Alizon M.** (1997)
Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry.
Science.; **276**(5320):1874-8.
- Plotkin, S.A., J. Farquhar, and E. Horberger.** (1976)
Clinical trials of immunization with the Towne 125 strain of human cytomegalovirus.
J Infect Dis. **134**:470-5.
- Plotkin, S.A., M.L. Smiley, H.M. Friedman, S.E. Starr, G.R. Fleisher, C. Wlodaver, D.C. Dafoe, A.D. Friedman, R.A. Grossman, and C.F. Barker.** (1984)
Towne-vaccine-induced prevention of cytomegalovirus disease after renal transplants.
Lancet. **1**:528-30.
- Plotkin, S. A.** (2001)
Vaccination against cytomegalovirus
Arch Virol Suppl **17**:121-34
- Pritchett, R.F.** (1980)
DNA nucleotide sequence heterogeneity between the Towne and AD169 strains of cytomegalovirus.
J Virol. **36**:152-61.

Quinnan GV Jr, Delery M, Rook AH, Frederick WR, Epstein JS, Manischewitz JF, Jackson L., Ramsey KM, Mittal K, Plotkin SA, et al (1984)

Comparative virulence and immunogenicity of the Towne strain and anonattenuated strain of cytomegalovirus

Ann Intern Med **101**(4): 478-83

Radsak, K.; Brücher, K.H.; Britt, W.; Shiou, H.; Schneider, D. and Kollert, A.(1990)

Nuclear compartmentation of glycoprotein B of Human Cytomegalovirus. *Viol.* **177**, 515-522.

Rasmussen L, Hong C, Zipeto D, Morris S, Sherman D, Chou S, Miner R, Drew WL, Wolitz R, Dowling A, Warford A, Merigan TC. (1997)

Cytomegalovirus gB genotype distribution differs in human immunodeficiency virus-infected patients and immunocompromised allograft recipients.

J Infect Dis; **175**(1):179-84.

Reyburn HT, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Davis DM, Pazmany L, Strominger JL. (1997)

The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells.

Nature; **386**(6624):514-7.

Roizmann, B., L.E. Carmichael, F. Deinhardt, G. De-The, A.J. Nahmias, W. Plowright, F. Rapp, P. Sheldrick, M. Takahashi, and K. Wolf. (1981)

Herpesviridae definition, provisional nomenclature and taxonomy.

Intervirology. **16**:201-17.

Roizmann, B., R.C. Desrosiers, B. Fleckenstein, C. Lopez, A.C. Minson, and M.J. Studdert (1992)

The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

Arch Virol. **123**:425-49.

Sambrook, J. ; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989)

Molecular cloning: A laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Schneeweis, K.E. (1962)

Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des Herpesvirus Hominis.

Z Immunitätsforsch Exp Ther. **124**:24-48.

Smith, M.G. (1956)

Propagation in tissue cultures of a cythopathogenic virus from human Salivary Gland Virus (SGV) disease.

Proc Soc Exp Biol. **92**:424-430.

Smith KL, Dunstan RA.(1993)

PCR detection of cytomegalovirus: a review.
Br J Haematol; **84**(2):187-90. Review.

Sodeik, B.; Ebersold, M.Wm and Helenius, A. (1996)

Mikrotubule and dynein mediated transport of incoming HSV- 1 capsids to the nucleus.
Poster Nr. 174
International Herpesvirus Workshop, Netherlands, 1996.

Spaete, R.R., and E.S. Mocarski. (1985a)

The alpha sequence of the cytomegalovirus genome functions as a cleavage/packaging signal for herpes simplex virus defective genomes.
J Virol. **54**:817-24.

Spaete, R.R., and E.S. Mocarski. (1985b)

Regulation of cytomegalovirus gene expression: alpha and beta promoters are trans activated by viral functions in permissive human fibroblasts.
J Virol. **56**:135-43.

Stinski, M. F. (1990)

Cytomegalovirus and its replication. in: Fields, B. N.; D.M. Knipe et al. (eds.): Virology, Vol.2, 2nd Edition, Raven Press, N.Y., 1989-91

Sullivan V, Talarico CL, Stanat SC, Davis M, Coen DM, Biron KK (1992)

A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells.
Nature ;**358**(6382):162-4.

Tooze, J., M. Holinshead, B. Reis, K. Radsak, and H. Kern. (1993a)

Progeny vaccinia and Human Cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes.
Eur J Cell Biol. **60**:163-78.

Triantos D, Boulter AW, Leao JC, Di Alberti L, Porter SR, Scully CM,

Birnbaum W, Johnson NW, Teo CG. (1998)

Diversity of naturally occurring Epstein-Barr virus revealed by nucleotide sequence polymorphism in hypervariable domains in the BamHI K and N subgenomic regions.
J Gen Virol.; **79** (Pt 11):2809-17.)

Van der Meer, J. T. M., Drew, W., Bowden, R., Galasso, G. J.,

Griffiths, P. D., Jabs, D., Katlama, L., Spector, S., Whitley, R.(1996)

Summary of the International consensus Symposium on Advances in the Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of cytomegalovirus Infection
Antiviral Research **32**: 119-40

- Van der Bij, W., Torensma, R., van Son, W. et al. (1988)**
Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leucocytes
J. Med. Virol. **25**: 179-188
- Vogelberg CU, Meyer-König U, Hufert FT, Kirste G and von Laer D. (1996)**
Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in renal transplant Recipients
J. Med. Virol. **50**:31-34
- Wada K, Mizuno S, Kato K, Kamiya T, Ozawa K. (1997)**
Cytomegalovirus glycoprotein B sequence variation among Japanese bone marrow transplant recipients
Intervirology **40**(4): 215-9
- Wathen, M.W., and M.F. Stinski (1982)**
Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection.
J Virol. **41**:462-77.
- Wright, H.T. Jr.; Goodheart, C.R. and Lielansis, A. (1964)**
Human cytomegalovirus. Morphology by negative staining.
Viol. **23**, 419-424.
- Yen-Liebermann, B. (2000)**
Diagnosis of Human Cytomegalovirus Disease
Clinical Microbiology Newsletter 22: 14, 105-9
- Zipeto D, Hong C, Gerna G, Zavattoni M, Katzenstein D, Merigan T, Rasmussen L. (1998)**
Geographic and demographic differences in the frequency of human
AIDS Res Hum Retroviruses **14**(6): 533-6
- Zong JC, Ciufo DM, Alcendor DJ, Wan X, Nicholas J, Browning PJ, Rady PL, Tying SK, Orenstein JM, Rabkin CS, Su IJ, Powell KF, Croxson M, Foreman KE, Nickoloff BJ, Alkan S and Hayward GS. (1999)**
High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations.
J Virol.; **73**(5):4156-70.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
amp	Ampicillin
bp	Basenpaar
bzw.	Beziehungsweise
C-terminal	Carboxy-terminal
DNA	desoxyribonucleid acid; Desoxyribonukleinsäure (DNS)
E. coli	Escherichia coli
GCV	Ganciclovir
gB	Glykoprotein B des HCMV
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPMPC	Cidofovir
HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
kb	Kilobasenpaar
kDa	KiloDalton
LB	Luria-Bertani
mA	Milliampere
MEIA	Mikropartikelimmunoassay
ml	Milliliter
mM	millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-terminal	Amino-terminal
ORF	Open Reading Frame; offener Leserahmen
ori	origin of replication
p	virales Protein
PCR	Polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion
PFA	Foscarnet
pH	potentia hydrogenii
pp	Phosphoprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Natriumacetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer

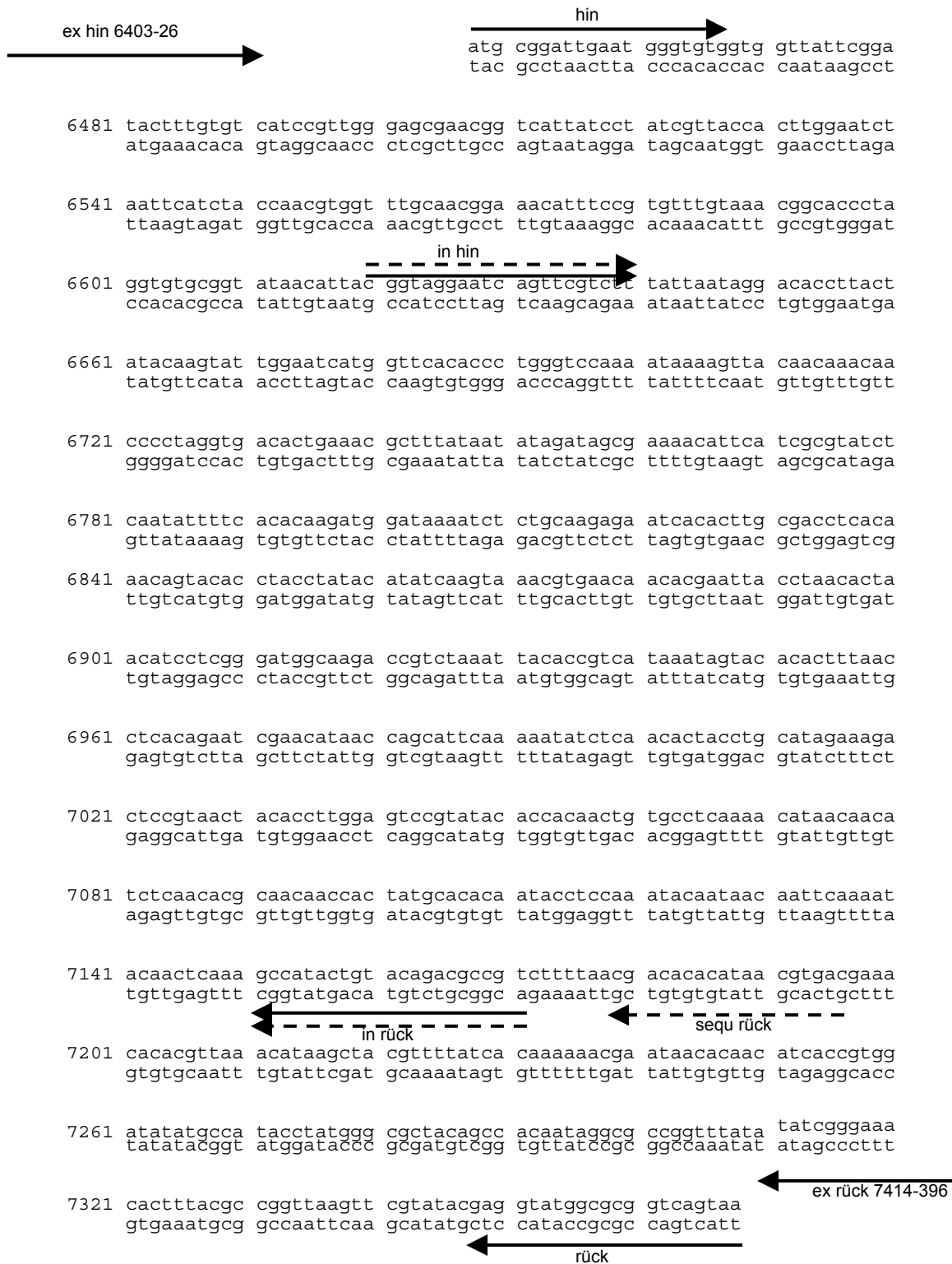
TEMED	N,N,N',N' -Tetramethylethyldiamin
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TR	terminal repeat
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UL	unique long
US	unique short
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
wt	wildtypisch

9.2 Buchstabencode der gängigen Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

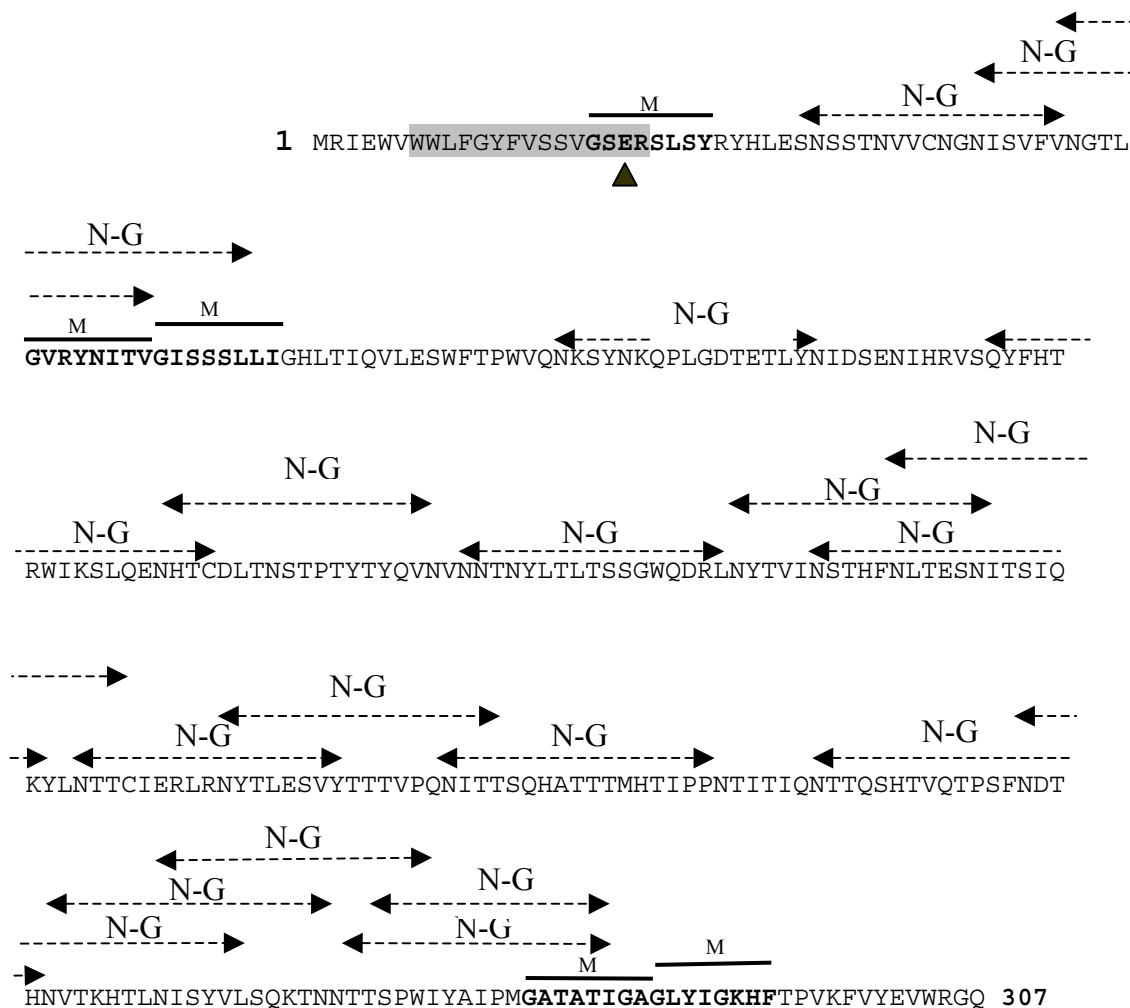
9.3 Nukleotidsequenz des UL 142 des HCMV-Stammes *Toledo* (Cha et al., 1996)

Verwendete Sequenzieroligonukleotide (siehe Kap. 3.15.1) sind als gestrichelte, Amplifizieroligonukleotide als durchgezogene (siehe Kap. 3.15.2) Pfeile dargestellt.



9.4. Deduzierte AS-Sequenz des UL 142 des HCMV-Stammes *Toledo* (Cha et al., 1999)

Potentielle N-Glykosylierungsstellen sind mit gestrichelten Doppelpfeilen gekennzeichnet (N-G). Potentielle Myristylierungsstellen sind fett gedruckt und mit schwarzen Balken markiert (M). Das potentielle Signalpeptid ist durch den grauen Balken hervorgehoben. Die vorhergesagte Schnittstelle wird durch das schwarze Dreieck angedeutet.



9.5 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Auswirkungen einer HCMV-Infektion in der Schwangerschaft
Abb. 2: Schematische Darstellung des humanen Cytomegalievirus (HCMV)
Abb. 3: Aufbau des Prototyp-Genoms des humanen Cytomegalievirus
Abb. 4: Schematische Darstellung des Vektors pGEM[®]-T
Abb. 5: Schematische Darstellung der *nested* PCR
Abb. 6: Elektrophoretische Auftrennung der durch Standard-PCR amplifizierten UL142 DNA-Fragmente
Abb. 7: Elektrophoretische Auftrennung der mittels *nested* PCR erhaltenen UL142 DNA-Fragmente
Abb. 8 a+b: Elektrophoretische Auftrennung der mittels Standard-PCR erhaltenen UL142-spezifischen Amplifikate von Isolaten HIV-positiver Patienten
Abb. 9 a+b: Elektrophoretische Auftrennung der mittels *nested* PCR erhaltenen UL142-spezifischen Amplifikate
Abb.10: Schematische Darstellung des Konstrukts pGEM[®]-T UL142
Abb.11: Elektrophoretische Auftrennung der durch Restriktion des Konstruktes pGEM[®]-T mit NcoI und SacI erhaltenen Fragmente
Abb.12: Exemplarische Darstellung der Analyse mittels „Gelassemble“ eines Teilbereichs (Nukleotid 1-146) der UL142-spezifischen Sequenz des Isolats S691
Abb.13: Phylogenetische Analyse der UL142-Sequenzen
Abb.14: Alignment der UL142-spezifischen Sequenzen der untersuchten HCMV-Isolate auf Aminosäureebene

9.6 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Vertikale Übertragungswege einer HCMV-Infektion
Tab. 2: HCMV-Erkrankungen bei Immunsupprimierten
Tab. 3: Klassifizierung der humanpathogenen Herpesviren
Tab. 4: Unterschiede zwischen wt-HCMV und attenuierten Laborstämmen
Tab. 5: Untersuchte Patientenisolats
Tab. 6: Oligonukleotide für die Sequenzierung
Tab. 7: Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion (PCR)
Tab. 8: Amplifikation des ORF UL142 von HCMV-Isolaten mittels PCR/ *nested* PCR
Tab. 9: Prozentuale Übereinstimmung der UL142-spezifischen Nukleotidsequenzen der HCMV-Isolate mit Stamm Toledo
Tab.10: Schematische Darstellung des Plasmids pGEM[®]-T UL142

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten an der Philipps-Universität Marburg:

Aumüller, Austermann, Czubayko, Cetin, Dibbets, Feuser, Flores de Jacoby, Folz, Gente, Hochban, Jungclas, Katschinski, Kern, Lehmann, Lotzmann, Mengel, Mittag, Pieper, Radsak, Ramaswamy, Stachniss, Stelzel, Sundermeyer, Weihe, Wenz und Wissner.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. K. Radsak möchte ich mich ganz herzlich für die Bereitstellung des Themas und die außergewöhnliche fachliche wie persönliche Unterstützung während meiner Arbeit bedanken.

Dr. Grit Meyer und Dr. Dorothee Gicklhorn danke ich besonders für die engagierte Betreuung.

Dr. Markus Eickmann, Dr. Tanja Strive, Heike Schmitz, Dr. Stephan Rinn, Sabine Seibert, Inge Lettermann-Nass, sowie allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für ihre stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Dr. Jürgen Stech danke ich für seinen Rat bei der Auswahl und Anwendung der Phylogenetischen Programme.

Björn Johannsen möchte ich für seine Freundschaft danken und Andrea Koll für „Erbsenzählerei“ und Erste-Hilfe-Maßnahmen gegen den „Blues“.

Der Parchamschen Stiftung zu Lübeck danke ich für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums.

An dieser Stelle sei auch meinen Eltern und meinem Bruder Kai für die Ermöglichung meines Studiums gedankt.